

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Estudio del efecto de la inflamación sistémica
crónica sobre la evolución de la lesión
aterosclerótica experimental.
Aproximaciones terapéuticas.**

TESIS DOCTORAL

M^a ESTHER MARCOS LLANES

Madrid, 2007

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Estudio del efecto de la inflamación sistémica
crónica sobre la evolución de la lesión
aterosclerótica experimental.
Aproximaciones terapéuticas.**

**M^a ESTHER MARCOS LLANES
LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Directores: GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA
RAQUEL LARGO CARAZO**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ. MADRID**



Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Doctor en Medicina y Profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña Raquel Largo Carazo, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que Doña M^a Esther Marcos Llanes, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el laboratorio de Patología Osteoarticular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 21 de Diciembre de 2006.

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Dra. Raquel Largo Carazo

Doctoranda: M^a Esther Marcos Llanes

A mis Padres.
A Borja.
A César.

Agradecimientos

Ante todo, agradecer a los doctores G. Herrero-Beaumont y J. Egido por confiar en mi y permitirme realizar la tesis en su laboratorio. Además tengo que agradecerles su preocupación por la continuidad de mi trabajo y su apoyo para terminar esta tesis.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por la concesión de la beca que me ha permitido formarme estos años y obtener estos resultados.

A Raquel, por contar conmigo, por enseñarme lo que es trabajar en un laboratorio y por dirigirme en esta tesis.

A Olga, por todo el tiempo que ha invertido en mi trabajo, por su apoyo constante y sus buenas ideas para encauzar este trabajo. Te echamos de menos por Madrid.

A la gente de Reuma: Emilio y Santos, por su paciencia en las reuniones; Fredi, por sus aportaciones a este trabajo, y Laura, siempre tan amable

A toda la gente que ha pasado por el laboratorio de Reuma: Esther, Juan, M^a Ángeles, Mónica y Mercedes; por ser unos buenos compañeros y ayudarme con mis “experimentos”. Sobre todo gracias a Míriam por animarme en todo momento, por ayudarme y por compartir muchos momentos. Gracias por ser una buena amiga.

A Charo por su interés y sus aportaciones en este trabajo

También quiero dar las gracias a toda la gente del laboratorio de la 4^a planta. Especialmente a las niñas: Cristina, Elsa y Eva, por esos momentos únicos camino de los cursos de doctorado, por esos cafés y por esas conversaciones llenas de risas. Gracias también a Bea, por sus consejos, y a Van, por su sonrisa. Chicas sois geniales. Gracias también a Alberto, por su optimismo, a Julio, por comprenderme, y a Jon, por su apoyo. Gracias también a Albertito, a Conchi, a Alberto 3^o, a Virginia y Álvaro por animarme en los últimos momentos.

A Paco, por su alegría y por los buenos ratos en el animalario.

A las chicas del animalario, Pilar y Juani, por ayudarme con los “animalitos” y por sus cafés.

A mis compañeros de la Facultad por confiar en mí.

A Eva, por fin!! Gracias por estar siempre cuando te necesité. Ahora te toca a ti. ¡Ánimo!.

A mis compañeras de master: las Marías, Cristina y Eva, por vuestras palabras de ánimo en estos últimos meses y por esos momentos “inolvidables” durante las clases.

A Iri por sufrir mis buenos y malos momentos; has sido la mejor vecina que podía tener.

A César por ser paciente y comprensivo, por trasmitirme energía para realizar esta tarea y por hacerme feliz. Gracias.

A mis padres por ayudarme, entenderme y protegerme. Por darme los mejores consejos y creer en mi.
A mi hermano Borja, por su apoyo incondicional, a pesar de no entenderme muchas veces. Esto ha sido posible gracias a vosotros.

RESUMEN

OBJETIVOS: investigar cómo la inflamación sistémica crónica inducida por la artritis reumatoide (AR) acelera las lesiones vasculares en un modelo de aterosclerosis (AT) experimental en conejos. Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar las propiedades antiinflamatorias del celebrex (CX), el sulfato de glucosamina (SG) y el condroitín sulfato (CS) en las lesiones ateroscleróticas de este modelo mixto. **MATERIALES Y MÉTODOS:** dos modelos bien establecidos de AT y de AR se combinaron y sincronizaron en conejos blancos N. Zelanda. La AT se indujo mediante una dieta hiperlipidémica y una lesión vascular en la arteria femoral, y la AR se provocó por la inyección repetida de ovalbúmina. El fenotipo resultante, ARAT, se comparó con las dos enfermedades (AR y AT) y con los conejos sanos (S). Los animales se trataron durante todo el proceso con CX, SG o CS. Se recogió el suero, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y fragmentos de arterias femorales y aórticas. Se midió proteína C reactiva (PCR) e interleuquina -6 (IL-6) en el suero (por ELISA). El análisis morfométrico de las lesiones se realizó en tinciones con orceína. La expresión génica de MCP-1 y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la expresión proteica de COX-2 y metaloproteínasa -9 (MMP-9) se cuantificó por PCR a tiempo real y Western -blot. **RESULTADOS:** los niveles reactantes de fase aguda y de la expresión génica en PBMC aumentaron significativamente en los grupos ARAT y AT. El cociente del grosor íntima-media y el área de tinción de macrófagos en las arterias femorales fueron significativamente mayores en los grupos ARAT y AT. La expresión génica de MCP-1 y de COX-2 fue significativamente mayor en el grupo ARAT respecto al AT. Además la expresión proteica de MMP-9 también fue superior en el grupo ARAT. Los grupo ARAT y AT presentaron lesiones en la arteria aórtica. El tratamiento con CX redujo los parámetros metabólicos e inflamatorios, además mejoró las lesiones ateroscleróticas y sinoviales. Los tratamientos con SG y CS redujeron la inflamación sistémica, la activación pro-inflamatoria de las PBMC, y disminuyeron la actividad inflamatoria en la placa. **CONCLUSIONES:** nuestro estudio muestra que la inflamación sistémica agrava las lesiones vasculares en los conejos AT. La artritis crónica en estos animales produjo una sobreexpresión de las moléculas implicadas en la inflamación e inestabilidad de la placa junto a una mayor incidencia de lesiones aórticas. El CX disminuye la inflamación a nivel sistémico y de la lesión aterosclerótica. Tanto el SG como el CS reducen los marcadores de inflamación sistémica en los conejos ARAT. Añadido a este efecto, son capaces de mejorar la respuesta inflamatoria en las lesiones ateroscleróticas en la reestenosis, así como disminuir el número de placa en la aorta.

ABSTRACT

PURPOSE: To explore whether systemic inflammation induced by rheumatoid arthritis (RA) accelerates vascular lesions in an experimental model of atherosclerosis (AT) in rabbits. The objective of this study was to examine the anti-inflammatory properties of celebrex (CX), glucosamine sulphate (GS) and chondroitin sulphate (CS) on atherosclerotic lesions in a rabbit model of RA and AT. **METHODS:** Two well-established models of AT and RA were combined and synchronized in N. Zealand White rabbits. AT was induced by a hyperlipidemic diet plus an endothelial lesion at the femoral arteries, and RA was induced by ovalbumin immunization. The resulting phenotype RAAT was compared with rabbits with single diseases (RA and AT) and healthy rabbits (H. RAIAT rabbits were treated with CBX, GS or CS during all the study period.) Animals were killed at week 4 after challenge. Sera, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and specimens from femoral arteries and thoracic aorta were collected. C-Reactive protein and interleukin-6 were measured in sera (ELISA). Vascular morphometric analysis was performed on orcein stained vessel preparations. Macrophage infiltration of vessel walls was quantified with RAM11. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression (real-time PCR) and COX-2 and metalloproteinase-9 (MMP9) protein presence (western-blot) were also quantified. **RESULTS:** Acute phase reactants and PBMC gene expression were significantly increased in AT and RAAT. Intima-media thickness (IMT) and macrophage density in femoral arteries were significantly increased in AT and RAAT. Femoral MCP-1 and COX-2 genes were further over-expressed in RAAT with regard to AT. COX-2 protein was significantly higher in RAAT than in AT. Furthermore, femoral MMP9 was overexpressed in RAAT with regard to AT. Atherosclerotic plaques were present in AT and RAAT thoracic aortas, but none were found in H or in RA. CX was able to reduce metabolic and inflammatory parameters, moreover CX improved atherosclerotic and synovial lesions. GS and CS were able to reduce the markers of systemic inflammation, the pro-inflammatory activation of the peripheral blood mononuclear cells, and to decrease inflammatory activity in arterial plaque lesions. **CONCLUSIONS:** Our study shows that systemic inflammation aggravates vascular lesions in rabbits with AT. The addition of chronic arthritis to animals with AT resulted in the local and systemic up-regulation of key pathogenic molecules involved in plaque inflammation and instability along with a higher incidence of aortic lesions. CX acts directly decreasing inflammation on atherosclerotic plaque or at systemic level. GS and CS are capable to reduce the markers of systemic inflammation in RAAT rabbits. Along with these effects a clear improvement in the inflammatory response of the atherosclerosis lesions in the induced femoral re-estenosis as well as a decrease in the number of aorta arteriosclerosis plaques.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes.....	1
2. La artritis reumatoide: paradigma de las enfermedades inflamatorias.....	2
3. El papel de la inflamación en la aterosclerosis.....	4
3.1. El factor de transcripción NF-kB.....	6
3.2. Las metaloproteinasas	6
3.3. Las quimioquinas.....	7
3.4. Las moléculas de adhesión	8
3.5. Las citoquinas	9
3.6. La ciclooxigenasa.....	10
4. Los marcadores de riesgo cardiovascular.....	12
4.1. La proteína C reactiva.....	12
4.2. La dislipemia.....	13
4.3. El cociente del grosor íntima-media de la arteria carótida.....	13
5. Los tratamientos antiinflamatorios: los inhibidores de la COX-2.....	14
6. ¿Son los glicosaminoglicanos los nuevos agentes antiinflamatorios?.....	16
6.1. El sulfato de glucosamina.....	17
6.2. El condroitín sulfato.....	18
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Descripción del modelo experimental	21
1.1. Inducción de la artritis reumatoide.....	21
1.2. Inducción de la aterosclerosis experimental.....	22
1.3. Sacrificio y recogida de muestras.....	24

1.4. Esquemas de los modelos. Tratamiento farmacológico.....	25
1.5. Distribución de los animales en los grupos.....	26
2. Estudios realizados en suero.....	27
2.1. Estudios lipídicos.....	27
2.2. Medida de los reactantes de fase aguda	27
3. Estudios histopatológicos.....	27
3.1. Estudio de las arterias aorta y femoral.....	27
3.2. Estudio de la membrana sinovial.....	28
4. Inmunohistoquímica.....	29
5. Análisis de la imagen.....	29
6. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	30
7. Estudios de la expresión del ARNm.....	61
7.1. Extracción del ARN.....	30
7.2. Estudios de PCR a tiempo real.....	31
8. Estudios por Western-blot.....	31
9. Análisis estadístico.....	32
IV. RESULTADOS	33
A. Evaluación de un modelo experimental de artritis reumatoide y aterosclerosis. Análisis de la acción un inhibidor específico de COX-2, el celecoxib, sobre dicho modelo.....	33
1. Parámetros metabólicos	33
2. Inflamación sistémica.....	35
2.1. Medida de los reactantes de fase aguda en suero.....	35

2.2. Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en las células monocíticas circulantes.....	36
3. Estudio de la membrana sinovial.....	37
3.1. Estudio de la sinovitis.....	37
3.2. Expresión de la COX-2 en la sinovial.....	39
4. Estudio de la arteria femoral.....	40
4.1. Análisis de las lesiones vasculares.....	40
4.2. Medida de la expresión de ARNm de COX-2 y de MCP-1 en la arteria femoral.....	42
4.3. Expresión de MMP-9 y COX-2 en la arteria femoral.....	43
5. Estudio de la arteria aorta.....	44
B. Análisis de la acción de dos aminoglicanos, el sulfato de glucosamina y el condroitín sulfato, sobre el modelo experimental de artritis reumatoide y aterosclerosis	45
1. Parámetros metabólicos.....	45
2. Inflamación sistémica.....	47
2.1. Medida de los reactantes de fase aguda en suero.....	47
2.2. Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en las células monocíticas circulantes.....	48
3. Estudio de la membrana sinovial.....	49
3.1. Estudio de la sinovitis.....	49
3.2. Expresión de la COX-2 en la sinovial.....	51

4. Estudio de la arteria femoral.....	52
4.1. Análisis de las lesiones vasculares.....	52
4.2. Medida de la expresión de ARNm de COX-2 y de MCP-1 en la arteria femoral.....	54
4.3. Expresión de MMP-9 y COX-2 en la arteria femoral.....	55
5. Estudio de la arteria aorta.....	56
V. DISCUSIÓN	57
1. Análisis del modelo experimental de aterosclerosis asociada a artritis crónica ...	57
1.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos.....	58
1.2. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2.....	60
1.3. Estudio de las lesiones sinoviales.....	61
1.4. Estudio de las lesiones arteriales.....	61
2. Estudio de los efectos del tratamiento con celecoxib sobre el modelo combinado de AR y AT.....	64
2.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos.....	64
2.3. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2.....	64
2.3. Estudio de las lesiones sinoviales.....	65
2.4. Estudio de las lesiones arteriales.....	65
3. Estudio de los efectos del tratamiento con el sulfato de glucosamina y con el condroitín sulfato sobre el modelo combinado de AR y AT.....	68
3.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos.....	69
3.2. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2.....	70
3.3. Estudio de las lesiones sinoviales.....	71
3.4. Estudio de las lesiones arteriales.....	72

VI. CONCLUSIONES	75
VII. BIBLIOGRAFÍA	77

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetil salicílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
CE	Células endoteliales
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AR	Artritis reumatoide
CMLV	Células de músculo liso vascular
Col	Colesterol
COX	Ciclooxigenasa
CS	Condroitín sulfato
CV	Cardiovascular
CX	Celecoxib
DAB	Diaminobenzidina
DNTPs	Mezcla de deoxinucleotidos
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EP	Receptores de membrana de PGE ₂
FPP	Farnesil pirofosfato
GAG	Glicosaminoglicanos
Glucosamina-HCL	Hidrocloruro de glucosamina
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL-col	Lipoproteína de alta densidad unida a colesterol
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'-2-etanolsulfónico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
Ig	Inmunoglobulina
IκB	Subunidad inhibidora de NF-κB
IL-1	Interleuquina-1

IL-1β	Interleuquina-1 beta
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
IMT	Medida del grosor íntima-media del vaso
IFN-γ	Interferón gamma
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
NO	Óxido nítrico
MAPK	Proteínas quinasas de la familia MAP
MCF	Macrófagos
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos, también llamada CCL2
MMP	Metaloproteasas
MMP-9	Metaloproteasa 9
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF-κB	Factor nuclear- κ B
OA	Osteoartritis o artrosis
OVA	Ovalbúmina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Suero salino tamponado con fosfato
PCR	Proteína C reactiva
PCR_Q	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGES	Prostaglandina E sintasa
PGHs	Prostaglandina endoperóxido sintasa
PGI₂	Prostaciclina
PGSH	Proteoglicanos de sulfato de heparina vascular
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A2
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
SDS	Dodecil sulfato sódico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SG	Sulfato de glucosamina
STF	Suero de ternera fetal
TF	Factor tisular
TG	Triglicéridos

TIMP	Inhibidor tisular de las metaloproteasas de la matriz
TNF-γ	Factor de necrosis tumoral- γ
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TX	Tromboxano
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

I. INTRODUCCIÓN

1.- Antecedentes

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, caracterizada por la inflamación crónica, la respuesta inmune humoral-celular anormal e hiperplasia, que afecta principalmente a la membrana sinovial de las articulaciones y de etiología desconocida. Afecta como media al 1-3 % de la población mundial con predominio femenino y comienza generalmente pasados los 40 años. Se trata, no obstante, de una enfermedad mantenida por mecanismos inmunológicos del huésped que determinan la aparición de manifestaciones sistémicas y la convierten en prototipo de las enfermedades inflamatorias crónicas [Park et al., 1999].

Los estudios epidemiológicos han demostrado que existe un acortamiento de la esperanza de vida en los pacientes con AR, en comparación con los pacientes con artrosis y con la población general de edad, género, etnia, grado de tabaquismo, presión arterial, peso y estado socio-económico similar. De los veintinueve estudios observacionales más relevantes realizados, diecisiete muestran una expectativa de vida acortada entre tres y dieciocho años en los pacientes con AR [Sattar et al., 2003]. A pesar de las frecuentes complicaciones ocasionadas de forma "directa" por la enfermedad o por los tratamientos empleados, la primera causa de muerte en los pacientes con AR es la enfermedad cardiovascular relacionada con la aterosclerosis con un porcentaje del 35 al 50% [Dessein et al., 2002]. El grupo de Wolfe observó que 361 de 898 pacientes con AR murieron por enfermedad cardiovascular (40%). El seguimiento realizado durante 22 años en 448 pacientes con AR en por el grupo de Simmons mostró una mortalidad del 34 % por enfermedad circulatoria [Van Doornum et al., 2002]. Otro estudio realizado en Suecia encontró una tasa estandarizada de mortalidad en ambos sexos de 1,57, tanto para el conjunto de enfermedades cardiovasculares (1,46) como para la cardiopatía isquémica (1,54), fundamentalmente en los pacientes con AR. Del mismo modo, un trabajo realizado en el Reino Unido ha comprobado que la tasa estandarizada de mortalidad cardiovascular en 1.236 pacientes con poliartritis inflamatoria precoz es de 1,34 en los varones y de 2,02 en las mujeres que sufren AR..Se puede deducir que el exceso de mortalidad cardiovascular existe en la AR establecida y que estaría confirmado en los primeros años de las poliartritis inflamatorias con factor reumatoide positivo.

Sin embargo, debido a que la aterosclerosis es un complejo proceso multifactorial, aún no se conocen con detalle los mecanismos que subyacen a la incidencia aumentada de lesiones y eventos ateroscleróticos en la AR. No obstante, se conoce la participación activa de los fenómenos inflamatorios en la iniciación y en la inestabilidad de la placa arteriosclerótica, por lo que no es sorprendente que una enfermedad caracterizada por inflamación mantenida, como la AR, se asocie a un riesgo incrementado de aterosclerosis (AT) [Ross et al., 1999].

Estudios histológicos y con modelos animales han demostrado la importancia de mediadores inflamatorios, como los leucocitos y las citoquinas en la placa aterosclerótica. A su vez, los marcadores de inflamación sistémica como la proteína C reactiva (PCR), se utilizan como marcadores de riesgo cardiovascular. Se cree que la inflamación crónica debe actuar de forma sinérgica o independiente con los factores de riesgo tradicionales en la patogenia de la aterosclerosis y debe estar relacionado con el estado de hipercoagulación [Van Doornum et al., 2002]. Algunos autores respaldan la hipótesis de que la inflamación induce lesiones coronarias inestables, caracterizadas por abundantes moléculas inflamatorias y células inmunitarias en la región de los hombros, que actúan erosionando la corteza de colágeno que bordea al material ateromatoso [Sattar et al., 2003]. Además, existen similitudes sorprendentes entre la respuesta inflamatoria / inmunológica observada en el vaso, en la aterosclerosis y en la angina inestable, y en la membrana sinovial, en la artritis reumatoide [Pasceri et al., 1999].

2.- La artritis reumatoide: paradigma de las enfermedades inflamatorias

La inflamación es una respuesta rápida, humoral y celular amplificada e inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. En la respuesta inflamatoria, las citoquinas son los mensajeros fisiológicos y los polimorfonucleares, los monocitos-macrófagos y las células endoteliales son los efectores celulares. El tejido inflamatorio se caracteriza por los cuatro signos de Celso: tumor (aumento de tamaño, se debe al edema), rubor (enrojecimiento, se debe a la vasodilatación), calor (aumento de la temperatura, a causa de la vasodilatación y al aumento del consumo de oxígeno local) y dolor (único signo subjetivo, se debe al aumento de la presión en el tejido y la afectación de los nervios) [Nathan et al., 2002]. Dependiendo de las características temporales de la inflamación definimos dos tipos de respuesta:

- **La inflamación aguda** distinguimos tres puntos clave: cambios hemodinámicos, alteración de la permeabilidad vascular y modificaciones leucocitarias
- **La inflamación crónica** se caracteriza por una duración prolongada, daño tisular reparado por tejido de cicatrización, angiogénesis, fibrinólisis e infiltrado de células como monocitos, linfocitos y células plasmáticas. Se debe a la persistencia del agente inflamatorio o a agentes inflamatorios que desde el principio producen inflamación crónica (formas primarias). La célula fundamental es el monocito (y los linfocitos), que contiene abundantes lisosomas que degradan mejor a los neutrófilos, son más activos sintetizando y liberando sustancias al exterior [Süleyman et al., 2004].

La AR es una enfermedad sistémica, crónica y de etiología desconocida aunque se han propuesto agentes desencadenantes externos (mycobacterias, virus del tipo Epstein-Barr) y agentes internos (Ig G, colágeno tipo II). Esta enfermedad se localiza en las articulaciones sinoviales y provoca daño articular, dolor y limitación de la función articular. Además los pacientes pueden presentar manifestaciones extraarticulares y presentan una esperanza de vida acortada respecto a la población general [Nakayamada et al., 2005].

La membrana sinovial presenta tres capas de fuera hacia dentro: la capa articular compuesta por tejido fibroso, la capa subíntima formada por una matriz vascularizada de colágeno y fibronectina y la capa íntima formada por sinoviocitos. Los sinoviocitos son células pleomórficas con diversas funciones: regulan el cambio del líquido sinovial, sintetizan y secretan componentes de la matriz extracelular, presentan antígenos, regulan el metabolismo del cartílago articular y regulan el flujo sanguíneo sinovial.

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular compuesta por glicoproteínas, proteoglicanos y colágeno. Bajo condiciones inflamatorias, distintos estímulos como la interleuquina-1 β (IL-1 β) o el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) incrementan la actividad de las enzimas proteolíticas, principalmente la metaloproteinasa-1 (MMP-1) y MMP-3, dando lugar a la inflamación y a la destrucción articular.

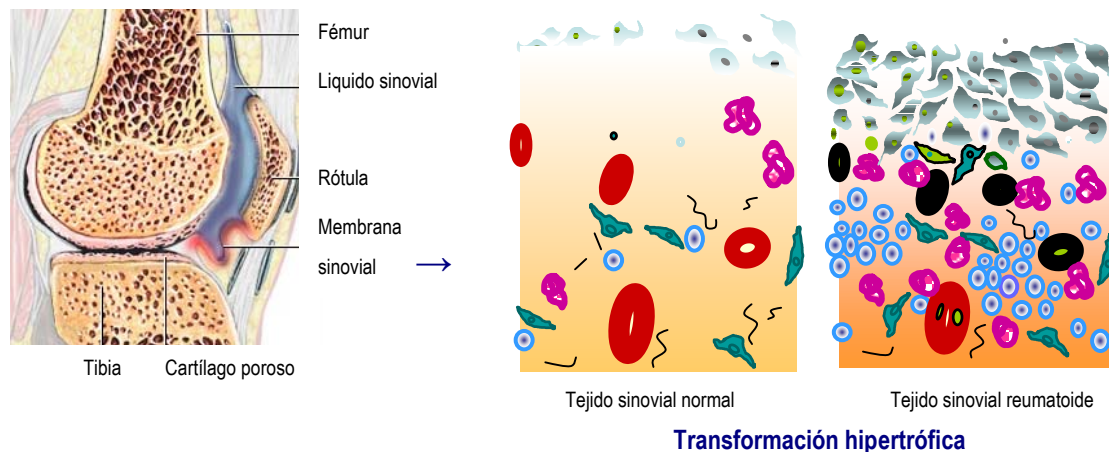


Figura 1: esquema de la rodilla como ejemplo de articulación. Diferencias entre el tejido sinovial normal y el tejido reumatoide: se produce una transformación hipertrófica caracterizada por la hiperplasia celular, infiltrado de macrófagos, angiogénesis y fibrosis.

La inflamación aguda en la AR se caracteriza por la degradación de la matriz y la formación de nuevos capilares, mientras que en inflamación crónica presenta un mecanismo de reparación tisular desorganizado, mediante la proliferación celular y el depósito de nueva matriz extracelular. Como se ha explicado la AR es una enfermedad sistémica, esto quiere decir que puede afectar a cualquier órgano del cuerpo (ojos, pulmones, piel, etc.). En el caso de no poder controlar la actividad de la enfermedad, puede producirse una complicación denominada amiloidosis, caracterizada por el depósito de la proteína SAA, otro reactante de fase aguda, en distintos órganos del cuerpo, dificultando el funcionamiento de éstos y empeorando el pronóstico de los enfermos que la padecen.

La enfermedad comienza cuando un agente activa a los linfocitos T y éstos migran a través del endotelio subsinovial produciendo edema y neovascularización. A continuación, se produce proliferación y diferenciación de células B y la activación de los macrófagos que liberarán IL-1 β , TNF- α y otros factores que estimulan a los sinoviocitos e inducen la expresión de moléculas de expresión endoteliales y MMPs. Esta liberación forma un *pannus* inflamatorio que invade los tendones, el hueso subcondral y el cartilago articular, perpetuando el daño [Nathan et al., 2002].

3.- El papel de la inflamación en la aterosclerosis

La aterosclerosis surge como respuesta inflamatoria y fibroproliferativa a distintos tipos de agresión al endotelio y al músculo liso de la pared vascular (CMLV) [Ross et al., 1993]. En condiciones normales, las células endoteliales (CE) permiten el intercambio de macromoléculas entre la luz y la estructura de la pared vascular para la nutrición de la capa media.

Se conoce como disfunción endotelial a los cambios estructurales y funcionales que sufre la pared arterial a consecuencia de una serie de procesos moleculares y humorales causados por factores de diversa naturaleza (infecciones virales o bacterianas, hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes e hiperhomocisteinemia) [Ross et al., 1999]. Esta alteración conlleva un aumento de la permeabilidad al paso de distintas sustancias a la pared vascular desde el endotelio.

Multitud de estudios demuestran el importante papel de los lípidos en las primeras fases de la aterosclerosis. En condiciones normales el transporte activo de las lipoproteínas de baja densidad desde el torrente sanguíneo hacia el espacio subendotelial (LDL) está regulado por el endotelio y la lámina elástica interna. Pero ante elevadas concentraciones plasmáticas de LDL, éstas pasan al espacio subendotelial, se concentran allí unidas a proteoglicanos y sufren el proceso de oxidación por los radicales libres de oxígeno producidos por macrófagos, CE y CMLV, dando lugar a las LDL oxidadas (LDLox). Las LDLox activan al endotelio y estimulan la expresión de moléculas de adhesión a las que se unen las células de estirpe monocito-macrófaga y los linfocitos T [Rangaswamy et al., 1997]. Éstos últimos migran a la capa íntima arterial mediante la intervención de moléculas quimioattractantes y los monocitos migran, por la actuación de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), hacia el foco de la lesión. Una vez en la íntima, los monocitos, expuestos a

los factores secretados por las CE y las CMLV, se activan, se diferencian en macrófagos e ingieren lípidos dando lugar a células espumosas. La monocapa formada por linfocitos T y macrófagos, junto con las LDLox, integra la “estría grasa” que puede progresar a una lesión fibroadiposa con el acumulo de macrófagos y CMLV, que migran desde la capa media. Se forma, en último punto, la placa fibrosa compuesta por tejido conectivo sobre un núcleo lipídico y células necróticas.

Los macrófagos activados y las células T complican la lesión al liberar mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas y factores de crecimiento que promueven la ruptura del colágeno, agregación plaquetaria, trombosis in situ, pérdida del óxido nítrico endotelial y liberación de radicales libres de oxígeno. Dicha complicación se traduce en hemorragias, necrosis, calcificación ulceración, trombosis y desarrollo de las manifestaciones clínicas [Manzi et al., 2000; Van Doornum et al., 2002].

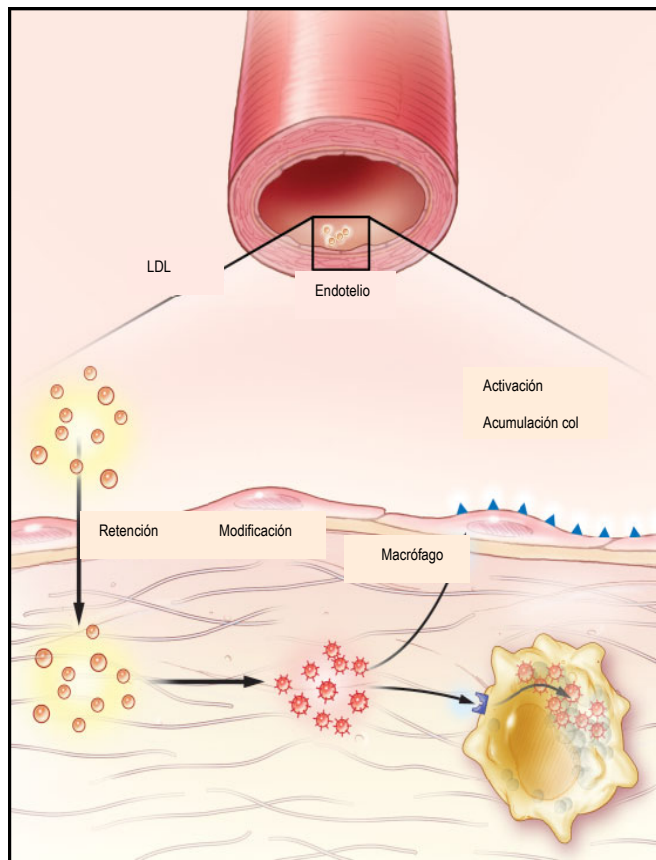
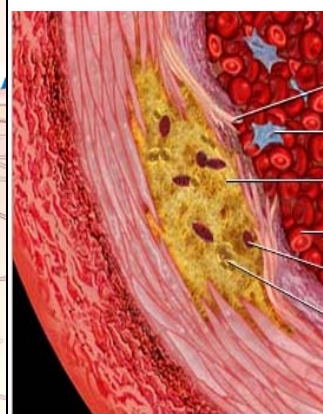


Figura 2: efecto de la infiltración de las LDL en la arteria inflamada (modificada de Hansson et al, 2005). En pacientes con hipercolesterolemia, el exceso de LDL se infiltra en la arteria y son retenidas en la íntima. Modificaciones oxidativas y enzimáticas favorecen a la liberación de lípidos inflamatorios que inducen a las células endoteliales a expresar moléculas de adhesión leucocitarias. Las LDL modificadas son recogidas por los receptores scavenger de los macrófagos, que evolucionan a células espumosas



- Desgarramiento pared arterial
- Macrófago
- Depósito de colesterol
- Glóbulo rojo
- Célula espumosa
- Depósito de grasa

3.1. El factor de transcripción NF-kB

El NF-kB es un factor de transcripción inducible y presente en todos los tejidos y es responsable de la regulación de los genes involucrados en la supervivencia celular, inflamación diferenciación y crecimiento. El NF-kB es activado en el citoplasma en respuesta a diversos estímulos que promueven su disociación de la proteína inhibitoria IκBα, y permite su entrada al núcleo y la unión a elementos reguladores.

Este factor media muchas respuestas inflamatorias y juega un importante papel en la expresión de COX-2 en muchos tipos celulares, incluyendo los fibroblastos sinoviales reumatoides. Se ha demostrado que muchos de los inductores de la expresión de COX-2 activan NF-kB mediante estudios de inhibidores farmacológicos de IκB kinasa [Chun et al., 2004; Kumar et al., 2004]. Este factor se une también a sitios específicos de las regiones promotoras de los genes de COX-2 y de las MMPs e induce su expresión, genes involucrados en la patogenia de la aterosclerosis [Jang et al 2004]

3.2. Las metaloproteinasas

Los macrófagos activados producen, además, una serie de enzimas denominadas metaloproteinasas (MMPs) que destruyen la matriz extracelular del tejido conectivo. Tanto la AT como la AR, son enfermedades caracterizadas por un balance alterado entre síntesis y degradación de la matriz extracelular [Libby et al., 2002].

Las MMPs que son sintetizadas por las células inflamatorias y por los fibroblastos sinoviales activados en la membrana sinovial reumatoide, participan en la degradación de la matriz y son capaces también de desestabilizar la placa arteriosclerótica; y provocar su ruptura con la consiguiente aparición de la clínica isquémica [Van der Wal et al., 1994; Posthumus et al., 2000; Tsuji et al., 2000]. Se ha estudiado el papel de la prostaglandina PGE₂ en el proceso inflamatorio y se ha probado su capacidad para aumentar la expresión de MMPs en los macrófagos, favoreciendo la inestabilización de la placa [Schonbeck et al., 1999]. En la AR, la actuación de IL-1β promueve la síntesis de MMPs, en concreto aumenta los niveles de la MMP-9 en la membrana sinovial, que degradan el cartílago degenerando la articulación y aumentando el dolor. Además la IL-1β fomenta la producción de moléculas de adhesión, la síntesis de prostaglandinas, la degradación de proteoglicanos, y la resorción de hueso en la AR [Chou et al., 2005].

3.3. Las quimioquinas

La proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1, también llamada CCL2) es una proteína básica de 76 aminoácidos con actividad quimiotáctica selectiva para fagocitos mononucleares y con un importante papel en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias. Los monocitos se diferencian al llegar al tejido en macrófagos que son los principales efectores de la inmunidad natural celular en los tejidos y sirven como presentadores de antígeno para iniciar la respuesta adaptativa.

Esta quimioquina es producida por las células endoteliales, tumorales y por los sinoviocitos; esta producción se ve incrementada por la presencia de los factores de riesgo cardiovasculares y por la disfunción endotelial. Los estudios de esta quimioquina han demostrado que la producción por las células mononucleares es dependiente de tejido. En el caso de la artritis reumatoide los macrófagos del tejido sinovial son los productores principales de MCP-1 [Egashira et al., 2003].

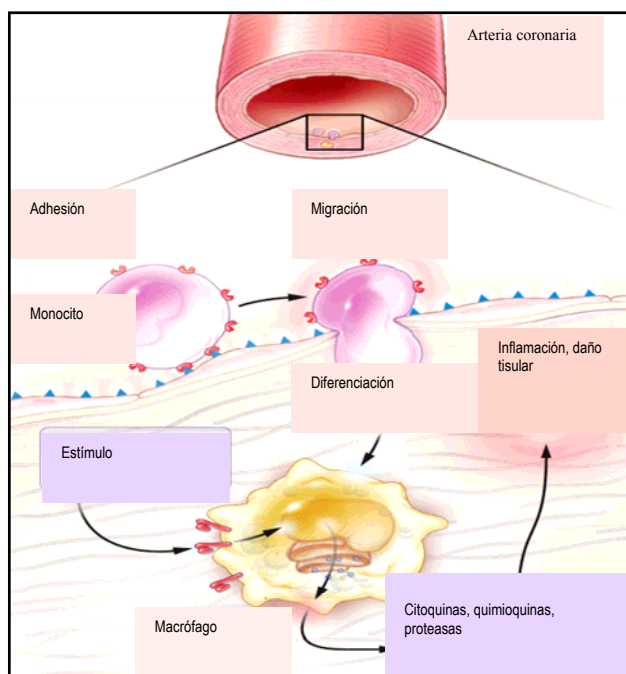


Figura 4: papel de los macrófagos en el inicio de la inflamación arterial (imagen modificada de Hansson et al, 2005). Los monocitos son reclutados hacia el endotelio activado y se diferencian a macrófagos. Los macrófagos liberan citoquinas inflamatorias, quimioquinas y proteasas favoreciendo la inflamación y el daño tisular

La quimioquina MCP-1 causa inflamación vascular crónica e induce trombosis, proliferación y migración de células del músculo liso vascular, angiogénesis y estrés oxidativo. La expresión de MCP-1 está aumentada en las lesiones ateroscleróticas y en las arterias dañadas. Se conoce que MCP-1 es quimiotáctico principalmente, pero no exclusivamente de monocitos, recluta también células T e induce citoquinas inflamatorias como IL-6 en células del músculo liso [Rand et al., 1996; Egashira et al., 2003]

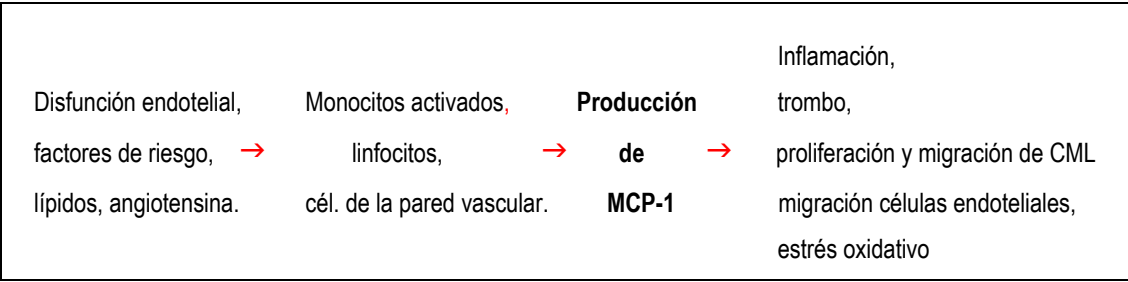


Figura 5: papel de MCP-1 en la vía de la patogénesis de la aterosclerosis, desestabilización de la placa y reestenosis.

3.4. Moléculas de adhesión.

Otro factor patogénico común a ambos procesos patológicos es la migración celular hacia el tejido lesionado. Se ha demostrado la activación de las moléculas de adhesión intercelular y vascular (ICAM-1 y VCAM-1), ambas pertenecientes a la familia de las integrinas, y de la selectina E tanto en sangre periférica como en la membrana sinovial en modelos experimentales de AR [Feldmann et al., 1996]. Estas moléculas tienen un gran protagonismo también en la formación de la placa arteriosclerótica, ya que son biomarcadores de la activación y de la disfunción endotelial, sobre todo en individuos con AR. Una elevada cantidad de moléculas de adhesión circulantes indican, además de la inflamación sinovial, un endotelio vascular expuesto a altas concentraciones de citoquinas circulantes [Libby et al., 2002].

La molécula ICAM-1 media la adhesión leucocito-célula endotelial y la trasmigración de los leucocitos. Existen trabajos que proponen la medida de los niveles séricos de la forma circulante de ICAM-1 para la predicción de eventos cardiovasculares en individuos aparentemente sanos [Van Doornum et al., 2002]. Resultados recientes muestran una relación inversa entre el flujo sanguíneo cardíaco y la producción de la ICAM-1 soluble de forma independiente a los factores de riesgo tradicionales y de los marcadores inflamatorios [Bencze et al., 2006]. Además, se ha encontrado una relación positiva entre el valor de la ICAM-1 soluble y de la VCAM-1 soluble con el grosor íntima-media de la arteria carótida en individuos con hiperlipidemia familiar combinada y en individuos con AR, respectivamente, lo que sugiere la que es un potencial parámetro predictor de la aterosclerosis [Dessein et al., 2005; Karasek et al., 2005].

3.5. Las citoquinas:

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño secretados en respuesta a antígenos que actúan a través de receptores de membrana. Las citoquinas de estirpe macrofágica, como el TNF α , la IL-1 y la interleuquina-6 (IL-6) se consideran factores patogénicos fundamentales en la AR y en la lesión arteriosclerótica [Manzi et al., 2000]. En la AR, estas citoquinas reclutan leucocitos mediante el incremento de la expresión de moléculas de adhesión y contribuye al daño del cartílago por la inducción de enzimas destructoras, como la colagenasa y la estromelisin. Las citoquinas circulantes durante el proceso inflamatorio, pueden contribuir a un proceso semejante en la pared del vaso, iniciando el crecimiento de la placa o desestabilizando una placa oclusiva [Dessein et al., 2005].

La IL-6 es la principal citoquina circulante en la respuesta de fase aguda y uno de los estímulos para la síntesis y la secreción hepática de la proteína C reactiva (PCR). Participa además en la producción de inmunoglobulinas por las células B y en las alteraciones neuroendocrinas. Esta citoquina estimula la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de MCP-1 por los macrófagos. La medida sérica de IL-6 se considera predictiva de futuros infartos de miocardio en sujetos aparentemente sanos, independientemente de la presencia o ausencia de factores de riesgo tradicionales y de los niveles de PCR [Van Doornum et al., 2002; Dessein et al., 2005]. Existe una asociación muy significativa entre los niveles de IL-6, pero no con los niveles de IL-1 ni de TNF α , y la disfunción endotelial. El TNF α , la IL-6 y la IL-1 estimulan la producción de casi todas las proteínas del complemento (sobre todo las de la vía alternativa), mientras que el TNF α estimula la producción de todos los componentes del complemento

El TNF α y la IL-1 son las principales citoquinas proinflamatorias de las articulaciones artríticas y estimulan la producción de IL-6 por los fibroblastos sinoviales. Estas citoquinas poseen un efecto amplificador, participando en la activación de otros mediadores, como las ya mencionadas moléculas de adhesión. El TNF α también actúa sobre las células endoteliales y los macrófagos, que producen citoquinas hematopoyéticas que al llegar a la médula ósea inducen un aumento de la generación de leucocitos (leucocitosis) [Dessein et al., 2005].

En la sinovial inflamada de las articulaciones reumáticas, las citoquinas derivadas de macrófagos, TNF α y la IL-6, están altamente expresadas. En la clínica se ha demostrado el protagonismo del TNF α como molécula efectora en el daño tisular reumatoide, al obtenerse una brillante respuesta clínica con los tratamientos dirigidos contra esta citoquina [Giles et al., 2005].

3.6. La ciclooxygenasa

La vía de degradación del ácido araquidónico es uno de los más conocidos mecanismos de inicio y amplificación de la reacción inflamatoria. Existen dos enzimas limitantes en la generación de metabolitos del ácido araquidónico, la fosfolipasa A2 (PLA₂) y la ciclooxygenasa (COX) o Prostaglandina endoperoxido sintasa (GPHs). La COX es una hemoproteína de membrana que cataliza la conversión del ácido araquidónico (AA) a PGH₂. Es una proteína bifuncional con dos actividades independientes; ciclooxygenasa y peroxidasa. COX cataliza dos reacciones secuenciales en distinto espacio pero mecanísticamente acopladas. La primera reacción es la ciclooxygenasa convierte el AA en PGG₂, seguido de la segunda reacción peroxidasa que reduce PGG₂ a PGH₂.

Se han descrito tres isoformas de la COX.

- La isoforma constitutiva **COX-1** está localizada en casi todos los tejidos del organismo, y su expresión parece estar regulada en situaciones muy concretas, como la diferenciación celular. Las PGs derivadas de esta enzima participan en las respuestas fisiológicas, como la homeostasis vascular, la reabsorción renal de Na⁺ y la citoprotección del estómago. Recientes estudios han demostrado la participación de esta enzima en el desarrollo de la AR [Onodera et al., 2004]
- La otra isoforma **COX-2**, es una isoforma inducible por estímulos inflamatorios (respuesta a citoquinas proinflamatorios, factores de crecimiento o endotoxinas) casi indetectable en condiciones fisiológicas normales (COX-2). Se expresa bajo circunstancias fisiopatológicas tales como inflamación, AR, angiogénesis, resorción ósea, hiperalgesia, cáncer de colon y mama y en la enfermedad de Alzheimer. La elevada producción de COX-2 se considera el mecanismo por el que aumentan los niveles de PGs durante la inflamación. Se ha identificado a COX-2 como responsable de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) durante los procesos inflamatorios y su participación en la AR es sobradamente conocida. En la actualidad la COX-2 es la diana terapéutica hacia la que se dirigen la mayor parte de las terapias utilizadas en AR.

Por otra parte, trabajos recientes han demostrado la implicación de estas enzimas, especialmente COX-2, en el desarrollo de aterosclerosis, asociada o no a patología inflamatoria y que COX-2/PGE₂ sería una posible diana terapéutica [Schonbeck et al., 1999; Hurt-Camejo et al., 2001]. La COX-2 se ha encontrado en macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales de las lesiones ateroscleróticas humanas. Múltiples estudios han localizado la COX-2 en la región de los hombros de las placas ateroscleróticas, colocalizadas con macrófagos y MMPs, enzimas que están implicadas en la desestabilización de las placas ateroscleróticas, causantes de la ruptura y de los síndromes ateroscleróticos. Se ha encontrado también una asociación entre el incremento de PGE₂ y el incremento

del grosor íntima/media, independientemente de los factores de riesgo CV tradicionales [Paramo et al., 2005]. En los últimos años se ha demostrado que la disminución en la actividad de COX-2 en la lesión aterosclerótica experimental se acompaña de una disminución en el número de macrófagos, así como en la expresión de MMP y factores quimiotácticos en el lugar de la lesión [Hernández-Presa., 2002].

- La isoforma recientemente identificada, **COX-3**, localizada en corazón y corteza cerebral, cuya función no es conocida [Bombardieri et al., 1981, DeWitt D et al., 1995].

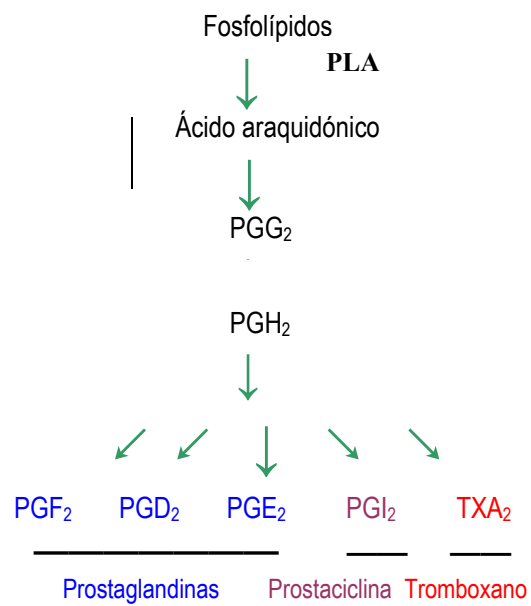


Figura 6: esquema de la biosíntesis de prostanoideos (modificado de Iñiguez et al., 2003)

4.- Marcadores de riesgo cardiovascular

4.1. Proteína C reactiva

En los últimos años, se ha propuesto incluso que la inflamación sistémica sea considerada como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de daño vascular [Blake et al., 2001]. En este sentido, la proteína C reactiva (PCR) se ha convertido en un marcador inflamatorio de gran valor predictivo de daño vascular [Hashimoto et al., 2001; Libby et al., 2002]. La PCR pertenece a la familia de las pentraxinas, se produce en el hígado como respuesta a las citoquinas TNF α y la interleuquina 1, y refleja una reacción inflamatoria de bajo grado atribuible a una inflamación crónica. Se ha demostrado recientemente que la PCR induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales humanas, lo que sugiere un papel directo en la adhesión celular y en la aterosclerosis [Van Doornum et al., 2002]. Esta proteína constituye también uno de los marcadores más fiables de actividad en la artritis reumatoide y está íntimamente ligado a la progresión y al pronóstico de la enfermedad. La determinación de los niveles séricos de PCR ofrece un fiel reflejo del proceso inflamatorio subyacente, ya que se correlaciona con otros marcadores como son: los niveles séricos de ICAM-1, IL-6, fibrinógeno, activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno y factor VII [Steffens et al., 2004; Devaraj et al., 2005; Roman et al., 2005].

Además la proteína C reactiva se relaciona directamente con los niveles séricos de triglicéridos e inversamente con los niveles de HDL-col. A pesar de que se puede encontrar a la PCR en la pared arterial del vaso aterogénico y de que estimula la producción de factor tisular por los macrófagos, no se conoce su función. Se han planteado hipótesis de su posible papel, una de ellas es que se encargaría de recubrir las partículas LDL para su posterior fagocitosis por el macrófago para formar la célula espumosa [Van Doornum et al., 2002; Dessein et al., 2002].

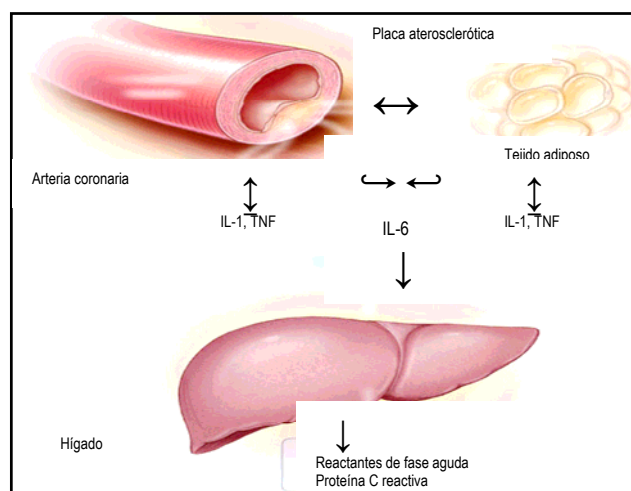


Figura 7: la cascada de citoquinas (imagen modificada de Hansson et al, 2005). En la placa aterosclerótica, las células inmunitarias activadas producen citoquinas inflamatorias que inducen la producción de IL-6. estas citoquinas se producen en diversos tejidos en respuesta a la inflamación y en el tejido adiposo en pacientes con síndrome metabólico. La IL-6 estimula a su vez a los reactantes de fase aguda, incluida la PCR, especialmente en el hígado. Esta cascada de amplificación permite que la

Un importante factor de riesgo en la enfermedad aterosclerótica es la dislipemia, caracterizada por una disminución de los niveles de las proteínas de alta densidad unidas a colesterol (HDL-col), un incremento de las proteínas de baja densidad (LDL) y un ratio LDL:HDL-col elevado, acompañada de una elevación del nivel de triglicéridos (TG) [Van Doornum et al., 2002].

Múltiples estudios han analizado los niveles lipídicos en suero de los individuos que sufren AR respecto a controles, los datos más consistentes muestran una disminución del parámetro HDL-col. El patrón de dislipemia en AR es claramente pro-oxidativo, está caracterizado por altos niveles de lípidos oxidados y bajas concentraciones de vitaminas A y E. Existen evidencias de que las citoquinas pueden promover la modificación oxidativa de LDL (LDL_{ox}), estimulando quizás la secreción de superóxido desde monocitos y células endoteliales. La hipótesis sugerida es que la liberación de citoquinas conlleva una dislipemia que promueve la oxidación, lo que favorece una mayor liberación de citoquinas.

Recientemente se ha identificado una forma de LDL modificada, rica en colesterol, como un marcador de riesgo de evento cardiovascular denominada lipoproteína (a) (Lp(a)). Se ha propuesto que la Lp(a) puede actuar como un reactante de fase aguda después de encontrar elevados niveles de Lp(a) en el suero de los pacientes con artritis reumatoide [Sattar et al., 2003].

4.3. El cociente del grosor íntima-media de la arteria carótida

El cociente grosor íntima-media (IMT) de la arteria carótida, medido por ultrasonidos, se emplea como un marcador de aterosclerosis temprana y de riesgo cardiovascular. Algunos grupos han documentado que el valor de IMT está incrementado en los pacientes con artritis reumatoide respecto a la población general, lo que sugiere la existencia de una aterosclerosis subclínica [Van Doornum et al., 2002].

En estudios poblacionales, los altos niveles de las citoquinas sistémicas o de los reactantes de fase aguda se correlacionan con la medida del grosor de la placa en las arterias carótidas detectadas por las técnicas tradicionales. Además estudios recientes realizados en pacientes con AR, asocian las concentraciones de ICAM-1, VCAM-1 y selectina E con la presencia de placa en la arteria femoral y con la IMT de la arteria carótida. Éstos datos sustentan la hipótesis de que la inflamación tiene un importante papel en la aterosclerosis [Dessein et al., 2002; Del Rincón et al., 2003; Grover et al., 2006]

5.- Tratamientos antiinflamatorios: inhibidores de la COX-2

Como se ha explicado, el exceso de mortalidad en artritis reumatoide es debido principalmente a la enfermedad cardiovascular y no se explica únicamente con los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales, de esta forma parece que la aterosclerosis está potenciada por una inflamación sistémica no controlada y que la terapia con fármacos antiinflamatorios usados en el tratamiento de la artritis reumatoide podrían reducir la aterosclerosis. Desde hace algunos años, los tradicionales fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), empleados en la mejora del tratamiento de la AR, están siendo reemplazados por inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2, llamados colectivamente coxibs. En la artrosis y en la artritis reumatoide el tratamiento con coxibs ha demostrado una mayor efectividad frente al placebo y una efectividad semejante a la de los AINE convencionales con menor toxicidad gastrointestinal. En esta tesis se estudia la acción del celecoxib (CX), una potente inhibidor selectivo de COX-2, utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide, la artrosis, la dismenorrea y el dolor agudo post-quirúrgico [Van Doornum et al., 2002].

La inhibición selectiva de COX-2 permite inhibir la producción de PGE_2 y de prostaciclina (potentes inhibidores de la agregación plaquetaria) sin inhibir la producción plaquetaria de tromboxano A_2 (vasoconstrictor y proagregante), lo que se traduce en un menor daño gastrointestinal en los pacientes. Sin embargo, el resultado de este desequilibrio podría potenciar el riesgo a padecer eventos cardiovasculares en los enfermos con artritis reumatoide.

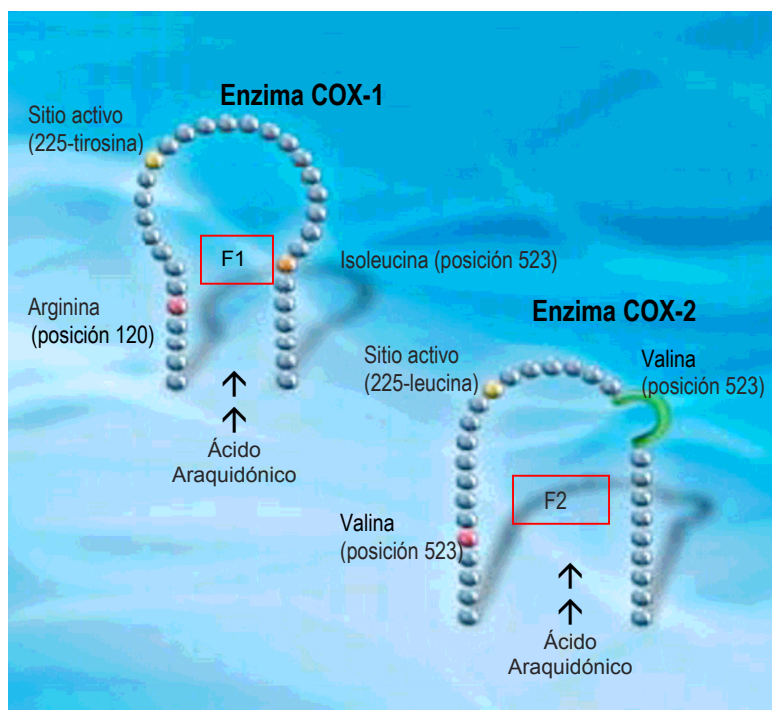


Figura 8. Las diferencias estructurales entre COX-1 y COX-2 explican la selectividad de los diferentes AINES. F1: fármaco no selectivo, F2: fármaco selectivo

Referencias: *Nature* 420: 846-852, 853-859, 860-867, 874-884 (diciembre), 2002 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 143-148 (enero), 2003

El estudio VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research) realizado en el 2004 para comparar la tolerabilidad gastrointestinal del rofecoxib (inhibidor selectivo de COX-2) frente al naproxeno (AINE tradicional) demostró un aumento de la incidencia de infarto de miocardio en los individuos que tomaban rofecoxib, lo que supuso su retirada del mercado y que se cuestionaran la seguridad de los otros coxibs. Se realizó también el estudio CLASS (Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study) cuyos resultados sobre el incremento de riesgo cardiovascular se han cuestionado por falta de datos concluyentes. Como COX-2 está relacionada con el mantenimiento de la homeostasis salina, acuosa y la filtración glomerular se analizó el nivel de creatinina sérica y de urea nitrógeno plasmática en ambos estudios.

El estudio CLASS mostró unos niveles significativamente mayores de ambos parámetros para el diclofenaco (antiinflamatorio tradicional) frente al celecoxib y el estudio VIGOR no mostró diferencias significativas. Otro factor analizado fue la hipertensión arterial, en el estudio CLASS la incidencia de este parámetro fue menor con el celecoxib comparado con el ibuprofeno. En el caso del rofecoxib, el estudio VIGOR mostró que la hipertensión arterial aparecía con dosis de 50 mg/día [Silverstein et al., 2000].

En la actualidad se están realizando estudios clínicos con el celecoxib, pero hasta el momento no se han encontrado evidencias claras de que incremente el riesgo a sufrir un evento cardiovascular en pacientes con AR. Actualmente se recomienda administrar una baja dosis de aspirina junto al inhibidor selectivo para conseguir un efecto antitrombótico y reducir el riesgo cardiovascular en pacientes artríticos que presenten factores de riesgo cardiovascular [Van Doornum et al., 2002; Paramo et al., 2005; Psaty et al., 2005].

La COX-2 está siendo estudiada por su asociación con el cáncer. Estudios inmunohistológicos han demostrado que COX-2 se expresa en células epiteliales malignas de varios cánceres sólidos humanos y en la neovascularización que alimenta al tumor. Se relaciona, por tanto, a COX-2 con la formación de tumores, con la angiogénesis y con la metástasis. De este modo, la inhibición específica de esta isoenzima limitaría el crecimiento tumoral y sería una nueva estrategia de actuación contra el cáncer. En la actualidad el celecoxib ha sido aprobado en los EEUU para el tratamiento de pacientes con poliposis adenomatosa familiar combinado con los tratamientos usuales, ya que se ha demostrado que reduce significativamente el número de pólipos colorectales adenomatosos. Además se ha demostrado que el celecoxib inhibe el desarrollo de tumores inducidos, en intestino, en esófago, en lengua, en pulmón y en piel, en modelos animales experimentales [Leahy et al., 2002; Kusunoki et al., 2002; Chun et al., 2004; Roh et al., 2004]

6.- ¿Son los glicosaminoglicanos los nuevos agentes antiinflamatorios?

En la actualidad los suplementos dietéticos con condroitín sulfato (CS) y con sulfato de glucosamina (SG) se están haciendo muy populares para el tratamiento de la artrosis tanto por su eficacia como por su seguridad.

Bajo la denominación de SYSADOA (Symptomatic Slow Acting Drugs for OsteoArthritis) se recogen una serie de medicamentos sintomáticos de acción lenta para la artrosis como son el ácido hialurónico, sulfato de glucosamina, diacereína y condroitín sulfato principalmente. Estas sustancias actúan no solo mejorando el dolor de los enfermos, sino también actúan sobre el metabolismo tisular produciendo un efecto estructural beneficioso (actividad condroprotectora). Sin embargo, tanto el ACR (American College of Rheumatology) como el EULAR (European League Against Rheumatism), aunque apuntan estudios que avalaran su uso, nos indican la necesidad de nuevos y mejores estudios para aclarar la actividad de estos medicamentos. De todas formas la EULAR da a estos fármacos la categoría 1A de evidencia científica en el tratamiento de los síntomas de la artrosis. El sulfato de glucosamina parece regular el metabolismo de la matriz cartilaginosa estimulando la síntesis de proteoglicanos e inhibiendo las enzimas degradadoras de cartílago favoreciendo así una posible regeneración articular. En 1996, la OARSI (Osteoarthritis Research Society International) incluyó en su clasificación de DOMAD (Disease Modifying Osteoarthritis Drugs) al condroitín sulfato, la glucosamina, y el ácido hialurónico, quedando así la clasificación de Agentes con Acción Modificadora del Curso de la Osteoartrosis.

Tanto el condroitín sulfato como la glucosamina forman parte de la familia de los glicosaminoglicanos (GAG), es decir, biomoléculas compuestas por muchas unidades repetidas de disacáridos, presentes en la matriz del cartílago. Los GAG participan en diferentes funciones fisiológicas, contribuyendo a la homeostasis del cartílago. El CS es extraído a partir de cartílago principalmente, y la glucosamina se purifica a partir del exoesqueleto de crustáceos; debido a la complejidad de la estructura de estos tipos de tejidos no es sencillo obtenerlos directamente. Por un lado, las proporciones en las que se encuentran estas moléculas en esos extractos de tejidos son muy pequeñas (menos del 10 %), y por otro lado, son moléculas que encontramos en forma bruta, por lo que es necesario purificarlas para obtener la forma activa. La importancia de purificar los extractos de cartílagos y los extractos marinos radica en que únicamente las formas purificadas de los GAG son las que han demostrado ser biodisponibles y eficaces en múltiples ensayos, tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Esto es debido a que, por ser moléculas puras, no tienen cadenas de disacáridos tan largas, lo cual significa que tienen un peso molecular más bajo. El menor peso molecular del CS y la glucosamina puros repercute en una mayor facilidad de absorción intestinal, por lo cual la eficacia y la biodisponibilidad es mayor. Por ello, los resultados conseguidos con las formas purificadas no se pueden extrapolar a las formas brutas, presentes en los extractos. Hay que tener presente que en los extractos el peso molecular

de los GAG es de varios millones de Dalton, mientras que el peso molecular del CS (de riqueza mayor del 95%) es de alrededor de 16.900 Dalton, mientras que el peso molecular de la glucosamina HCl (de riqueza mayor del 99%) es de 216 Dalton.

El **sulfato de glucosamina** es un amino-monosacárido que actúa como precursor de la biosíntesis de los glucosaminoglucanos y de los agregados proteoglicanos. La industria farmacéutica produce sulfato de glucosamina, hidrocloreto de glucosamina y N-acetil-glucosamina a partir de la quitina (un biopolímero presente en el exoesqueleto de los invertebrados marinos). La glucosamina se emplea en el tratamiento de la artrosis humana en base a sus efectos beneficiosos sobre la reconstrucción del cartílago dañado y por su posible capacidad inmunoreguladora. El sulfato de glucosamina se administra en una dosis oral de 1500 mg por día. A pesar de no tener transporte activo intestinal, como la dosis es baja, no interfiere con el metabolismo de los azúcares, pero algunos autores recomiendan un cuidado especial en pacientes con diabetes tipo II [Simánek et al., 2005].

Nuestro laboratorio estudió el efecto del sulfato de glucosamina en condrocitos de pacientes artrósicos *in vitro*. Los resultados demostraron que el tratamiento con SG inhibe la activación de NF- κ B en las células estimuladas con IL-1 β . Observamos que el SG previene la degradación del I κ B α en el citoplasma celular y su migración al núcleo. Además, demostramos que al preincubar de los condrocitos artrósicos con SG, se inhibe la expresión y la síntesis de COX-2, proteína que controla al NF κ B y que tiene un importante papel en la patogenia de la artrosis [Largo et al., 2003].

Otros estudios confirmaron y ampliaron nuestros resultados, el SG: suprime la acción de las citoquinas proinflamatorias en los condrocitos humanos, inhibe de la activación de NF- κ B y de la bioactividad de IL-1 β en condrocitos de rata y suprime la acción de la respuesta de las células T. Estudios recientes en ratones con encefalomiелitis experimental aguda, muestran que la glucosamina suprime selectivamente la respuesta de células Th1 e induce la respuesta de Th2 y que la adición de glucosamina a células inmunitarias *in vitro* previene su activación [Zhang et al., 2005].

Uno de los posibles papeles del SG exógeno es servir de fuente adicional de hexosaminas y de sulfatos precursores para la síntesis de GAG en el desbalance entre la síntesis y degradación de los componentes del cartílago característico de la AR. Además el hidrocloreto de glucosamina tomado vía oral previene la pérdida de GAG en el cartílago dañado por la inyección intraarticular de quimiopapaina en la articulación-[Chou et al., 2005].

Como ya se ha explicado, la disfunción endotelial generalizada incluye la aterosclerosis acelerada y está caracterizada por complicaciones diabéticas. La hiperglicemia mediante distintos mecanismos debe contribuir a aumentar la aterosclerosis: la glucosa puede aumentar el estrés oxidativo intracelular y generar especies reactivas de oxígeno en células endoteliales, activando los factores de transcripción sensibles a redox como NF- κ B y otros genes inflamatorios. La glucosamina es un precursor

de la biosíntesis de proteoglicanos e incrementa la producción de proteoglicanos, incluido el heparan sulfato (PGHS), en distintas células incluidas las células vasculares. El HSPG es disminuido por diversos agentes como lipopolisacáridos, TNF- α , homocisteína, lisolecitina y LDLox, agentes implicados en la reacción inflamatoria general y en la aterosclerosis. En las lesiones ateroscleróticas el contenido de PGHS está reducido y diversos estudios muestran una correlación negativa entre la cantidad de colesterol en la lesión y de PGHS. Recientes estudios *in vitro* muestran que los proteoglicanos inducidos por SG unen menos LDL, es decir, serían menos aterogénicos. Mediante el aumento de HSPG, la glucosamina exógena reduciría los eventos aterogénicos como el transporte de lipoproteínas, la retención de monocitos y la proliferación de SMC. Estos datos proponen al SG como un posible agente para el tratamiento de la AT [Duan et al., 2005].

El **condroitín sulfato** es un GAG con alto peso molecular y densidad de carga que compone la matriz extracelular del tejido conectivo, incluyendo el cartílago hialino, y aporta elasticidad. Se produce a partir de material cartilaginoso bovino o porcino y también del cartilago de tiburón, así que su formulación está influido por las estructuras y las características del material de origen. Numerosos estudios han demostrado su eficacia en tejido experimental y en tejido humano: acción antimutagénica (capta y elimina radicales libres), regula el crecimiento neural en modelos animales, acción analgésica y antiinflamatoria y acción antilipemiente en estudios animales.

El estudio GAIT (Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial) fue diseñado para evaluar la eficacia de la glucosamina, del CS y de la combinación de ambos, respecto al efecto del CX y de una sustancia placebo en pacientes con artrosis. El subgrupo de pacientes con dolor moderado-severo reveló que la terapia combinada de ambas sustancias disminuye significativamente el dolor de rodilla asociada a la artrosis. A pesar de no encontrar efectos significativos en el tratamiento con SG, los investigadores no excluyen el efecto positivo del SG en dicho subgrupo de pacientes. El tratamiento con CS disminuye significativamente la incidencia del encapsulamiento. En este estudio no observaron un incremento del riesgo CV entre los pacientes que tomaron CX ni en los pacientes diabéticos que tomaron SG. El tratamiento con CX presentó, además, una respuesta mucho más rápida que el tratamiento con CS, SG o combinado [Clegg et al., 2006].

Además de sus papeles en la articulación, ambos CS y SG poseen propiedades antiinflamatorias. Estudios *in vitro* han demostrado que el CS revierte los efectos de la IL-1 β en la síntesis de proteoglicanos y prostaglandinas en el condrocito e inhibe la función citolítica y que el SG disminuye la respuesta catabólica del cartílago y previene el incremento de la síntesis de óxido nítrico inducido por la IL-1 β .

Estudios realizados en ratas tratadas vía oral con una combinación de SG y CS han demostrado una mejoría clínica de la artritis experimental en cuanto a la incidencia de la enfermedad, a la temperatura y encapsulamiento

de la articulación, daño en el cartílago y en la síntesis de IL-1 β y MMP-9. La reducción de la IL-1 no ocurre sólo en la articulación, aparece también en el suero de las ratas tratadas con la dieta combinada. Se ha demostrado también que un tratamiento combinado de CS y SG disminuye los signos de la artritis reumatoide en caballos, conejos y perros. Otros experimentos sobre los efectos de CS y SG en las condiciones del cartílago articular, han demostrado que estos agentes pueden alterar a los componentes de la cascada inflamatoria, incluyendo la disminución de la producción de PGE2 y, por tanto, reducir el daño en el cartílago [Chou et al., 2005]. Otro producto que contiene SG, CS y extractos herbales usado en el tratamiento de la AR es el OK205, se ha demostrado su eficacia en la disminución de la producción de IL-6 y en la reducción de la producción de TNF- α , pero no de la IL-8, en una línea celular mastocítica humana [Choi et al., 2004].

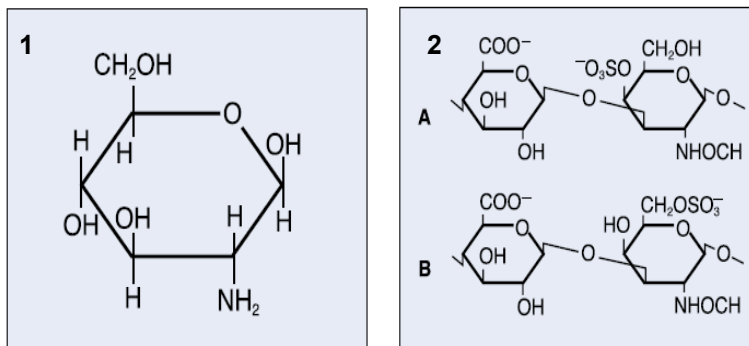


Figura 9: estructuras químicas. 9.1. Estructura química de la glucosamina. 9.2. Estructura química del condroitín 4 sulfato (A) y 6 sulfato (B)

II. OBJETIVOS

En la fisiopatología de la artritis reumatoide y la aterosclerosis existen vías patogénicas comunes, de índole pro-inflamatoria, que probablemente se potencien y justifiquen así la elevada susceptibilidad que muestran los enfermos con artritis reumatoide a padecer eventos cardiovasculares asociados a la aterosclerosis. Sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos biológicos de dicha sinergia, así como la eficacia de posibles intervenciones terapéuticas o los efectos que determinados fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de la artritis reumatoide puedan tener sobre la evolución de la aterosclerosis asociada. En parte, la escasez de conocimientos proviene de la ausencia de un modelo animal que permita estudiar en profundidad los aspectos mencionados.

En esta tesis nos propusimos desarrollar un modelo experimental animal que reprodujera la enfermedad humana, es decir, una aterosclerosis acelerada en el contexto de la inflamación sistémica provocada por una artritis crónica.

En primer lugar, estudiamos el efecto que la inducción de una artritis crónica muy activa tuvo sobre la evolución de las lesiones ateroscleróticas en un modelo experimental en conejos hiperlipidémicos, en los que se provoca previamente una lesión endotelial con nitrógeno líquido. En concreto estudiamos:

- a. El perfil metabólico.
- b. La actividad inflamatoria sistémica mediante la medida sérica de los reactantes de fase aguda IL-6 y PCR.
- c. EL estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2.
- d. La gradación histopatológica de las membranas sinoviales, así como la expresión proteica de COX-2.
- e. La gradación histopatológica y el infiltrado de macrófagos en las lesiones de la arteria femoral, así como la expresión génica y proteica del MCP-1, la MMP-9 y la COX-2 en la misma placa.
- f. La gradación histopatológica en las placas artrosclerosas observadas en la arteria aorta.

En segundo lugar, estudiamos los efectos sobre la lesión vascular y la inflamación sistémica de un inhibidor selectivo de la COX-2, ya que existen dudas sobre la potencialidad proaterogénica de estas moléculas, habitualmente utilizadas en el tratamiento de la artritis reumatoide en el humano.

En tercer lugar, analizamos la acción de dos glicosaminoglicanos, el sulfato de glucosamina y el condroitín sulfato en el mismo modelo; moléculas consideradas reguladores naturales de la respuesta inflamatoria.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- DESCRIPCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Los estudios se realizaron en conejos machos New Zeland (Granja Universal, Pamplona, España) de 2,5 a 3 Kg. de peso (media $2,8 \pm 0,2$ Kg.). Todos los animales fueron manipulados según la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) y se distribuyeron al azar en varios grupos. Dos modelos bien establecidos de artritis inducida por antígeno y aterosclerosis se indujeron simultáneamente.

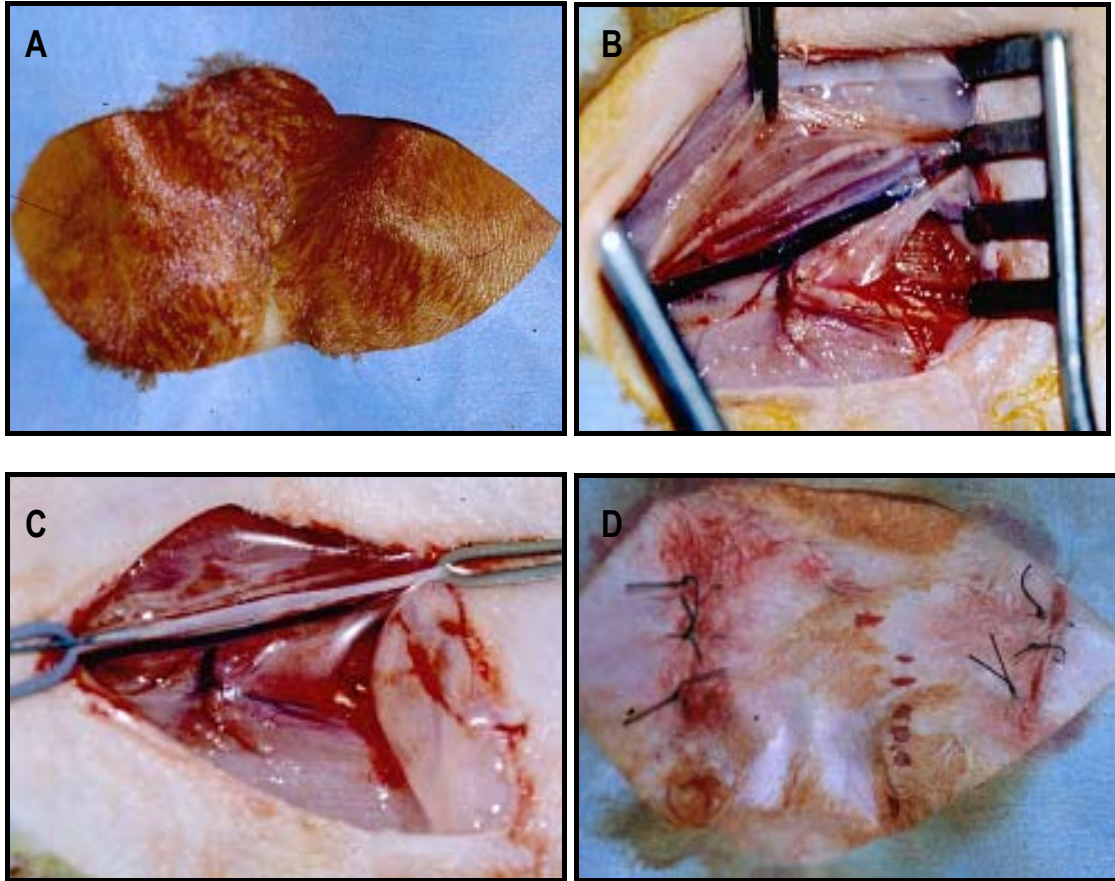
1.1.- Inducción de la artritis reumatoide crónica

Para desarrollar este proyecto es necesario en primer lugar establecer el protocolo del desarrollo de este modelo animal que actualmente no está descrito. Nuestro laboratorio tiene una amplia experiencia en el modelo de artritis por antígeno (AIA) en conejos previamente inmunizados con ovoalbúmina (OVA) a los que posteriormente se les realiza una inyección intraarticular de OVA. Esto les provoca una lesión articular inflamatoria de características similares a la artritis reumatoide humana. Este modelo tiene una fase aguda en la que es apreciable tanto la inflamación local como sistémica, y que dura entre 2 y 4 días. Posteriormente las lesiones articulares evolucionan de una forma similar al desarrollo de una artritis crónica en humanos, aunque la inflamación sistémica es prácticamente inapreciable. Para el correcto desarrollo del modelo de aterosclerosis secundaria a la artritis, es necesario que los animales mantengan un cierto grado de inflamación sistémica al igual que ocurre en los enfermos con artritis reumatoide. Con este fin, pusimos a punto en primer lugar un modelo de artritis por antígeno en conejo más agresivo que el anterior [Palacios et al.,1998; Sánchez-Pernaute, 2003]. Para la inducción de la enfermedad, los conejos se inmunizaron con 4 mg/ml de ovalbúmina (OVA, SIGMA, St. Louis, MO) disuelto en adjuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI) en proporción 1:1. Dos semanas después se reinmunizaron con el mismo inmunógeno. Cinco días después de la segunda inmunización, el antígeno (5 mg de OVA disuelto en 1 ml de suero salino estéril) se inyectó en ambas rodillas. Estas inyecciones se repitieron una vez cada semana durante tres semanas más. Los animales se sacrificaron 48h después de la última inyección intraarticular de OVA.

1.2.- Inducción de la aterosclerosis experimental

Se utilizó un modelo de aterosclerosis acelerada en el que se reproducen las lesiones similares a las que desarrollan los humanos. La aterosclerosis se indujo mediante la administración de una dieta hiperlipemiante combinada con desecación endotelial de un segmento aislado de ambas arterias femorales, según una técnica descrita previamente, con mínimas modificaciones: se utilizaron conejos de menor peso, el segmento aislado fue de 2cm y se redujo el tiempo de exposición de la femoral al nitrógeno gas a 60 segundos [Hernández-Presa et al., 1997; Hernández-Presa et al., 2002; Hernández-Presa et al., 2003]. La dieta aterogénica administrada se compone de 2% de colesterol y 6% de aceite de cacahuete (Panlab, Barcelona, España). La aterosclerosis se indujo por desecación endotelial según un método descrito por Lee Veen. Media hora antes del comienzo de la intervención, realizada en esterilidad, se administraron 125 mg/kg de cefazolina (Laboratorios Llorente, Madrid, España) por vía intramuscular como medida de profilaxis antibiótica.

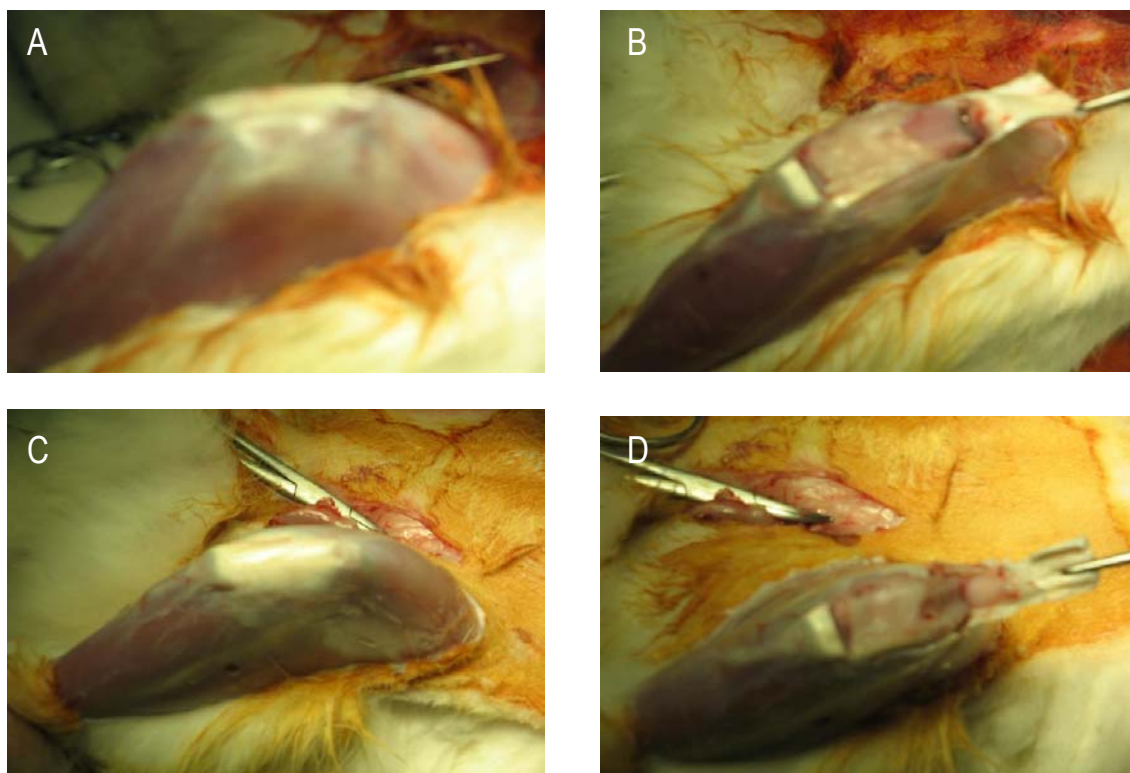
Los animales se anestesiaron con 5 mg/kg de xylazina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y 35 mg/kg de Ketamina (Ketolar, Parke-Davis, Barcelona, España) por vía intramuscular. Además se anestesió localmente mediante una inyección subcutánea de Lidocaína al 1% (Braun, Barcelona, España). Se preparó el campo estéril, se desecó la femoral y se aisló un segmento de 2 cm de longitud mediante ligaduras. En la zona proximal de dicho segmento se realizó una punción de escape y en la zona distal se canuló con una aguja de 27-G, por la que se difundió primero suero salino estéril y, posteriormente, 80 ml/min. de nitrógeno gas durante 1 min. Finalmente, se lavó de nuevo con suero salino se quitaron las ligaduras, se hizo la hemostasia por compresión, se marcó la zona lesionada mediante clips de titanio (Ethicon, Somerville, NJ, EEUU) y se saturó la herida. Se repitió el proceso en la femoral contralateral.



Fotografías representativas de la inducción del daño endotelial en la arteria femoral. A: esterilización de la zona a intervenir. B: aislamiento de la arteria femoral. C: la zona distal se canula y se infunde nitrógeno gas durante un minuto. D: sutura de la zona intervenida

1.3.- Sacrificio de los animales y recogida de las muestras

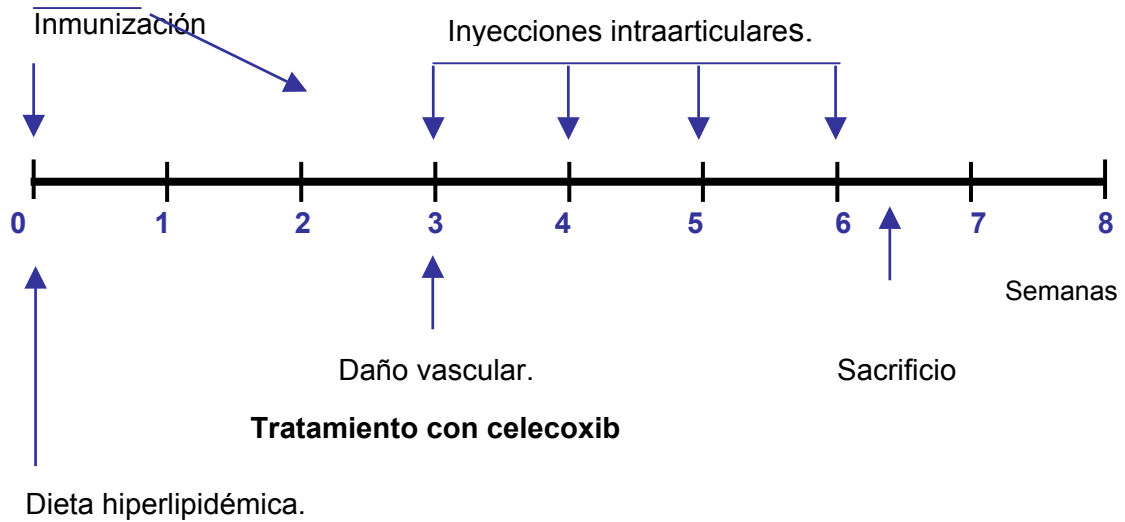
Los conejos se anestesiaron como se ha descrito previamente. Se expuso la arteria femoral, se canuló el vaso y se infundió suero salino. A continuación se ligó el vaso y se extrajo el segmento dañado que se congeló en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular. Se realizó el mismo proceso en la otra arteria y el segmento extraído se incluyó en paraformaldehído al 4 % en PBS (fosfato sódico dibásico 9,1 mM, fosfato sódico monobásico 1,7 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para el estudio histológico. Seguidamente se expuso la arteria aorta y se realizó el mismo proceso para extraer un segmento de 4 cm que se dividió a la mitad, un segmento para el estudio molecular y el otro para el estudio histológico. Se extrajeron también los polos renales para el estudio histológico y el molecular, previamente perfundidos con suero salino. A continuación, se sacrificó a los animales por sobredosis cardiaca de pentotal sódico (Abbot, Madrid, España) y se extrajeron las membranas sinoviales y las patelas del conejo. La membrana sinovial se dividió en dos para el estudio molecular y para el estudio histológico.



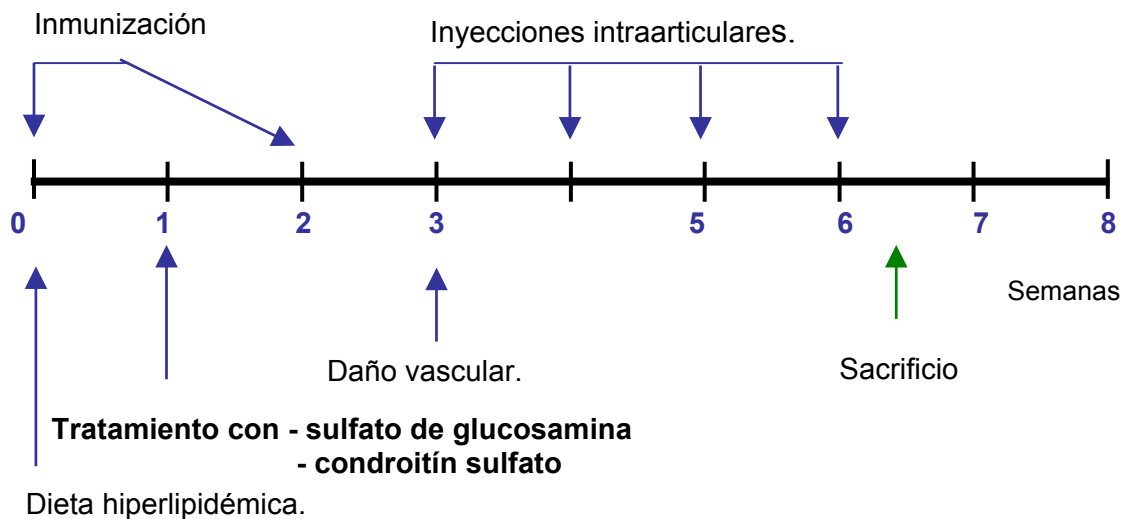
Fotografías representativas de la extracción de la membrana sinovial durante el sacrificio de un conejo con AR aguda. A: rodilla sana expuesta. B: membrana sinovial sana. C: rodilla expuesta de un conejo con AR aguda. D: membrana sinovial de un conejo con AR aguda.

Esquema de los modelos y distribución de los animales en distintos grupos:

MODELO I: TRATAMIENTO CON CELECOXIB



MODELO II: TRATAMIENTO CON CONDROITÍN SULFATO Y SULFATO DE GLUCOSAMINA



Distribución de los animales :

- 13 conejos sanos: **Sanos**
- 13 conejos con dieta compuesta por 2% de colesterol + 6% aceite cacahuete y daño vascular en ambas arterias: **AT**
- 14 conejos con doble inmunización intradérmica en el lomo con 5 mg/ml de ovoalbúmina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) en adjuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI, EEUU) basado en el método de Howson. Durante 4 semanas los conejos se sometieron a inyecciones intraarticulares de 1 ml de OVA (5 mg/ml) en ambas rodillas: **AR**
- 15 conejos con ambas enfermedades aterosclerosis + artritis: **ARAT**
- 14 conejos con las dos enfermedades tratados con celecoxib (Celebrex®, Pfizer) 10 mg/kg/día vía oral (AR+AT+CX): **CX**
- 13 conejos con las dos enfermedades tratados con sulfato de glucosamina (Xicil®, Rottapharm SA) 500 mg/kg/día vía oral (AR+AT+SG): **SG**
- 9 conejos con ambas enfermedades tratados con condroitín sulfato (Bioibérica, España) 100 mg/kg/día disuelto en 1ml de suero salino vía intraperitoneal (AR+AT+CS) : **CS**

2.- ESTUDIOS REALIZADOS EN EL SUERO

El día antes del sacrificio, se extrajeron 10 ml de sangre de la vena marginal de la oreja de los animales en ayunas (12h) con el fin de analizar el nivel de lípidos y los parámetros inflamatorios sistémicos.

2.1.- Estudios lipídicos

El colesterol total, el colesterol HDL (HDL-Col), los triglicéridos (TG) y la glucosa se midieron mediante técnicas estándar por medio de un autoanalizador (Abbot VP Biochromatic Analyzer) y con métodos enzimáticos estándar (BioMeriux, Lyon, France).

2.2.- Medida de los reactantes de fase aguda

Los niveles de proteína C reactiva (CRP) y de la citoquina interleuquina 6 (IL-6) se analizaron mediante dos kits de ELISA específicos siguiendo las instrucciones del fabricante (Alpha Dyagnostics International, San Antonio, TX, EEUU y R&D Systems Minneapolis, MN, EEUU, respectivamente)

3.- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

3.1.- Estudio de las arterias aortas y femorales.

Después de fijar las arterias con formaldehído al 4% en PBS, se dividió cada fragmento en cuatro partes iguales y se embebieron en parafina. A continuación se realizaron cortes de 4 μ m de grosor con el microtomo (Micron, Francia) y se fijaron en portaobjetos pretratados con 3-(aminopropil)triethoxisilano (APES) (Sigma) al 2% de acetona (v/v). Posteriormente se desparafinaron e hidrataron para realizar la tinción de hematoxilina-eosina y de orceína.

El programa de morfometría utilizado fue Imagine-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA) y las imágenes se tomaron con una cámara Nikon FDX-35 (Nikon, Tokio, Japón).

3.2.- Estudio de la membrana sinovial.

Después de fijar y cortar las sinoviales como se ha descrito previamente para las arterias, el grado de lesión tisular se evaluó con la tinción de hematoxilina-eosina siguiendo la escala de Krenn (Krenn et al, 2002).

La densidad de células infiltrantes se midió mediante escala semicuantitativa de 0 a 3 puntos; el grado 0 corresponde a una membrana sinovial normal, el 1 a un leve infiltrado de leucocitos o presencia focal en el tejido, el 2 a un infiltrado moderado y congestión vascular y el 3 a un infiltrado masivo con focos de tejido necrosado, hemorragias y trombosis vasculares.

Escala de valoración histopatológica de la sinovitis de Krenn [Krenn et al., 2002].

A. INTIMA

- 1-2 capas, escasa densidad celular.0
- Hiperplasia focal.1
- Hiperplasia difusa leve o alta densidad celular.2
- Hiperplasia focal importante o difusa moderada.3

B. ESTROMA

- Poco celular, escasa vascularización y matriz.0
- Aumento focal de vascularización1
- Alta vascularización, aumento de fibroblastos, fibrosis perivascular2
- Hipervascularización y fibrosis difusa3

C. INFILTRADO INFLAMATORIO

- Escaso leucocitos.0
- Focos aislados1
- Focos amplios2
- Múltiples focos organizados3

4.- INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de los tejidos (arterias y membranas sinoviales) embebidos en parafina fueron desparafinados y rehidratados. La actividad de la peroxidasa endógena se anuló incubando los cortes en peróxido de hidrógeno al 3%: metanol (1:1) durante 30 min. A continuación se realizó la digestión enzimática con tripsina (Sigma, España) al 0,1% en Tris-HCL (50 mM con CaCl_2 al 0,01 pH 7,8) a una temperatura de 37°C durante 30 min.

Con el fin de bloquear la unión inespecífica se incubó el tejido con un tampón bloqueante compuesto por suero de cabra al 6% y albúmina de suero bovino (BSA) al 4% en PBS a pH 7 durante 1h.

El anticuerpo monoclonal para macrófagos de conejo (RAM-11, DAKO, Carpintería, CA, California, EEUU) se diluyó a una concentración final de 84 $\mu\text{g/ml}$ en suero de cabra al 1% y BSA al 4% y se incubó durante 1h. El anticuerpo secundario, anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado con biotina (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), se diluyó 1:100 en BSA al 4% y se incubó durante 1h. A continuación, se añadió el complejo Estreptavidina-biotina/fosfatasa alcalina (StreptABComplex/AP, DAKO, Carpintería, CA, California, EEUU) durante 30 min para amplificar la señal. Como cromógeno se utilizó una solución de diaminobenzidina (DAB, DAKO, Carpintería, California, CA, EEUU) de 0,5 mg/ml en H_2O_2 al 0,02%.

El tejido se contrastó con la tinción de hematoxilina, se deshidrató y se montó en medio DPX. Para detectar las uniones no específicas, cada muestra se incubó con su propio control negativo sin añadir el anticuerpo primario.

5.- ANÁLISIS DE LAS IMAGENES

El programa de morfometría utilizado para el estudio de las arterias fue Imagine-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA)

Las preparaciones de inmunohistoquímica se digitalizaron mediante el microscopio Olympus (BH-2) conectado a una vídeo cámara CCD y las imágenes se analizaron mediante un programa informático Olympus.

6.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

En el momento del sacrificio se extrajeron 30 ml de sangre heparinizada de la arteria de la oreja de los conejos para el aislamiento de las células mononucleares periféricas (PBMC). La sangre se diluyó en suero salino en proporción 1:1 y se separaron las células en 5ml en gradiente de solución de aislamiento de neutrófilos Lympho Separation Medium (ICN Biomedicals, Ohio, EEUU) por centrifugación a 2000g durante 30 min. Las células mononucleares periféricas se recogieron, se lavaron 2 veces con suero salino y se resuspendieron en tampón A (20mM Hepes-NaOH pH 7,6, 20 glicerol (v/v), 0,35 M NaCl, 5mM MgCl₂, 0,1 EDTA, 1mM DTT, 0,5 mM PMSF) y en Tripure para su posterior tratamiento. Se realizó el estudio de la expresión génica de COX-2 y MCP-1 en PBMC como se describe a continuación.

8.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE ARNm

8.1.- Extracción de ARN

Los tejidos, las arterias y las membranas sinoviales, congelados en nitrógeno líquido se pulverizaron en la cámara metálica congelada. El ARN total se obtuvo utilizando la técnica de guanidina-fenol-cloroformo (TriPure Isolation Reagent, Roche, Indianapolis, IN, EEUU). Los tejidos fueron lisados por tratamiento con 1 ml de TriPure Isolation Reagent añadiéndose 200 µl de cloroformo y se centrifugó durante 15 minutos. Con la extracción se consiguió eliminar el ADN y las proteínas de la fracción celular inicial, quedándose el ARN en la fase superior acuosa. A continuación se recogió dicha fase, se añadió 500 µl de isopropanol y se centrifugó 8 minutos a 4°C. El precipitado resultante se lavó con 1ml de etanol al 100% frío y, una vez seco, se resuspendió en H₂O tratada con dietil pirocarbonato.

La concentración y pureza del ARN se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración del ARN (1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml), mientras que la relación 260/280 nos indica su pureza (una relación cercana a 2 corresponde a un ARN sin contaminación proteica)

8.2.- Estudios de PCR a tiempo real (PCRQ).

Mediante el kit ADNc Archive de alta capacidad (Applied Biosystems), fue retrotranscrito 1 µg del ARN total para obtener ADNc total utilizando 2,5 U/µl de una transcriptasa reversa durante 2 h a 37°C. Como controles negativos se utilizaron muestras no retrotranscritas.

La cuantificación del RNA específico se realizó usando una PCR a tiempo real single-reporter utilizando el Sistema de Detección de secuencia ABI Prism 7500 (Applied Biosystems).

Se emplearon sondas TaqMan FAM específicas para COX-2 Y MCP-1 (Applied Biosystems) y se utilizó un ensayo prediseñado de ARN ribosomal (ARNr) 18S (Applied Biosystems) como control endógeno.

Para realizar la PCR a tiempo real se utilizó el programa de ciclos térmicos del Sistema de Detección de secuencia ABI Prism 7500 (95° C 10 minutos), 40 ciclos en los que se repetían los dos pasos de la PCR, desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y unión / extensión a 60° C 1 minuto.

El ARNm de COX-2 y de MCP-1 se normalizó con respecto al ARNr 18S en cada pocillo, y el valor obtenido para la expresión de cada gen se normalizó con respecto al valor calibrador (calibrador = 1). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

9.- ESTUDIOS POR WESTERN-BLOT

Las proteínas se obtuvieron mediante el lisado de los tejidos por el método guanidina-fenol-cloroformo y se almacenaron en el tampón adecuado con inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinchonínico (BCA, Pierce, Rockford, IL, EEUU), incubando una alícuota de las muestras durante 30 minutos a 65 °C, y midiendo posteriormente en el espectrofotómetro a 562 nm.

Se tomaron 50 µg de proteínas totales de todas las muestras, se les añadió tampón de carga y β-mercaptoetanol, y se corrieron en geles con distintas proporciones de acrilamida, según el peso de las proteínas a estudiar, en una solución de Tris, glicina y SDS. Después, las membranas de polivinilideno (Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU) se equilibraron en metanol y agua, y se realizó la transferencia en tampón de transferencia (Tris, glicina, SDS, y metanol).

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo (3% BSA, 5% leche en polvo, 0,1% Tween-20, en PBS) durante una hora a temperatura ambiente, y después se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 (al 0,3%), y se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido también en la solución de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se volvieron a lavar 3 veces con PBS-Tween-20, se revelaron con el reactivo luminescente ECL (Amersham) y se expusieron a películas Hyperfilm ECL (Amersham). Para asegurar

que se habían cargado cantidades iguales de proteínas, también hibridamos las membranas con un anticuerpo anti- α -tubulina (Sigma). Las autorradiografías se densitometraron y los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) respecto a la hibridación de las mismas membranas con el anticuerpo para la tubulina.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron:

COX-2 (Santa Cruz Biotechnology)

MMP-9 (Oncogene) como anticuerpo secundario un antirátón conjugado con peroxidasa (Sigma)

10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico aplicado a los datos numéricos y a las evaluaciones semicuantitativas se realizó utilizando el SPSS11.1 para Windows (SPSS Inc).

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM) y se analizaron por el test U de Mann-Whitney. Para las comparaciones múltiples se realizó el test de Kruskal-Wallis. La presencia de placa en la aorta de los animales y el nivel de significación se determinó usando tablas de contingencia mediante el análisis de la chi-cuadrado. La significación estadística se definió como $p < 0,05$

Los resultados de densitometrado, en unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) como n-veces sobre el control, se expresan como la media \pm EEM.

IV. RESULTADOS

A.- EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y ATEROSCLEROSIS. ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DE UN INHIBIDOR ESPECÍFICO DE COX-2, EL CELECOXIB, SOBRE DICHO MODELO.

1. PARÁMETROS METABÓLICOS.

La extracción de 10 ml de sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos en ayunas y su posterior centrifugación para la extracción del suero permitió la determinación de los siguientes parámetros bioquímicos mediante un autoanalizador.

Los animales que recibieron dieta especial presentaron un incremento significativo de colesterol total y de los niveles de triglicéridos, acompañados de una disminución significativa de colesterol-HDL. El grupo de animales ARAT presentó unos niveles de colesterol total y de triglicéridos significativamente mayor que el grupo sano ($p=0$, $p=0,048$ respectivamente), mientras que el nivel de HDL-colesterol y el ratio Col-HDL fueron significativamente inferiores ($p=0$ en ambos casos). Los valores de colesterol sérico y triglicéridos fueron estadísticamente significativamente superiores para el grupo AT que para el grupo ARAT ($p=0,03$, $p=0$ respectivamente).

Grupos	Colesterol total (mg/dl)	Col-HDL (mg/dl)	Ratio Col-HDL	Triglicéridos (mg/dl)
Sanos (n =20)	50±4	37±3	0,75±0,03	74±10
ARAT (n =18)	1861±68 *	18±2*	0,01±0,001 *	89±11
ARAT+CX (n =14)	2039±42 *,&	8±0,6 *,&	0,004±0,0004 *,&	122±14 *,&
AT (n =16)	2402±180 *,&	21±2 *	0,01±0,001 *	205±13 *,&
AR (n =14)	89±8	17±2 *	0,21±0,03 *	93±17

Tabla 1: datos bioquímicos analizados en el suero de los diferentes grupos de conejos. n: número de conejos, *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT.

Como se expone en la tabla 1, el tratamiento con celecoxib modificó al alza el nivel de colesterol total respecto al grupo ARAT ($p=0,045$), sin embargo el coxib redujo el nivel de triglicéridos en suero de forma significativa ($p=0$) respecto al grupo con ambas enfermedades. En cuanto al nivel de colesterol-HDL y el ratio Col- HDL, el fármaco disminuyó significativamente dichos valores ($p=0$ en ambos casos). El grupo AR respecto al grupo ARAT presentó un valor de colesterol total inferior ($p=0$) y un valor del cociente col- HDL muy superior ($p=0$).

En la tabla 2 se recogen los datos d la ganancia de peso de los animales. Los animales fueron pesados desde el comienzo del estudio y posteriormente, de manera semanal, hasta el momento del sacrificio. Los animales que ganaron más peso fueron los sanos, el grupo AT y el grupo con sólo cirugía. El grupo ARAT sufrió una ganancia de peso significativamente menor que los sanos ($p=0$) y que los animales AT ($p=0,004$). El tratamiento con celecoxib permitió una mejora de dicho parámetro respecto al grupo con ambas enfermedades ($p=0,009$).

La creatinina se incrementó de forma significativa en los grupos AT, ARAT y AR+Cir respecto a los animales sanos ($p=0$ en todos los casos). El tratamiento disminuyó significativamente el valor de la creatinina sérica respecto al grupo que sufre la artritis y la aterosclerosis ($p=0$).

La glucosa medida en suero fue significativamente menor en el grupo ARAT que en el grupo de los animales sanos y AT ($p=0$ en ambos casos). Los conejos tratados con el inhibidor selectivo de COX-2 presentaron un incremento de glucosa en suero significativo respecto al modelo mixto, marginalmente significativo, frente al grupo sano y al grupo AT ($p=0,07$ y $p=0,06$ respectivamente).

Grupos	Ganancia de peso (Kg.)	Creatinina (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)
Sanos (n =20)	1,07±0,03	1,1±0,1	253±6
ARAT (n =18)	0,34±0,02 *	1,6±0,1 *	183±5 *
ARAT+CX (n =14)	0,82±0,04 *,&	1,3±0,03 *,&,#	238±8 &
AT (n =16)	1,42±0,08 *,&	1,7±0,1 *,&	257±3 &
AR (n =14)	0,66±0,03 *,&	1,1±0,06 &	176±4 *

Tabla 2: datos de la ganancia del peso durante el ensayo y valores de glucosa y creatinina en el suero de los distintos grupos de conejos. n: número de conejos, *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT; #: $p<0.05$ vs AT.

2. INFLAMACIÓN SISTÉMICA.

2.1 Medida de los reactantes de fase aguda en suero.

La interleuquina-6 es un mediador clave en la AR, su inhibición reduce la sinovitis y mejora los síntomas (Choy et al, 2004 abstract). Se realizó la medida en suero de IL-6. Todos los grupos de animales presentaron un incremento significativo respecto a los conejos sanos. Los grupos ARAT y AT presentaron valores semejantes ($396,3 \pm 27$ vs $383,3 \pm 21$; $p=1$). El tratamiento con el inhibidor selectivo de COX-2 redujo la IL-6 de forma significativa frente al grupo ARAT ($324,7 \pm 16$ vs 396 ± 27 ; $p=0$).

La proteína C reactiva se correlaciona con el incremento del grosor íntima/media de la arteria carótida de los pacientes con AR, éstos presentan un incremento de relación íntima/media elevada respecto a los individuos sanos. Existen estudios que asocian también la movilización del calcio y la inflamación con los cambios en la pared arterial (Nagata-Sakurai et al, 2003. abstract). Además, la PCR indica de manera directa la presencia de aterosclerosis en pacientes con AR (González-Gay et al, 2005. abstract). La proteína C reactiva, medida en suero mediante un elisa específico de conejo, se incrementó significativamente en todos los grupos respecto a los conejos sanos. En el caso de los animales AT se produjo una disminución significativa de la PCR respecto al modelo mixto ($20,7 \pm 1,4$ vs $138,7 \pm 21$; $p=0$). Además, el tratamiento con el celecoxib logró reducir significativamente este parámetro ($43,7 \pm 5,2$ vs $138,7 \pm 21$; $p=0,001$), pero con valores superiores al grupo AT ($43,7 \pm 5,2$ vs $20,7 \pm 1,4$; $p=0,004$).

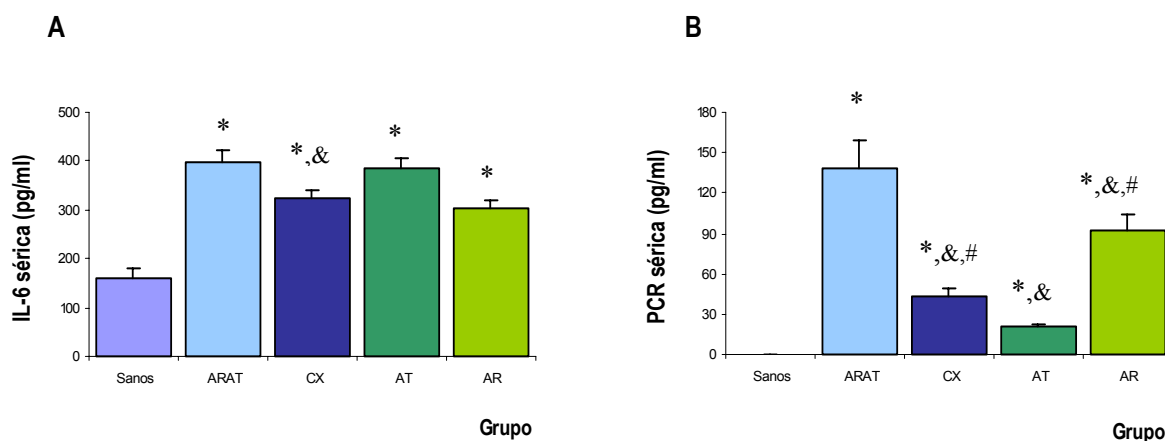


Figura 1: medida sérica de los reactantes de fase aguda IL-6 y PCR por ELISA de los distintos grupos de conejos. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT; #: $p<0.05$ vs AT. Número de conejos: sanos $n=20$, ARAT $n=18$; CX $n=14$; AT $n=16$, AR $n=$

2.2 Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en las células monocíticas circulantes.

La expresión de COX-2 medida, por PCR a tiempo real, en células monocíticas circulantes se incrementó significativamente en todos los grupos estudiados. El grupo ARAT no presentó valores estadísticamente significativos respecto al AT ($7,7 \pm 1,4$ vs $11,2 \pm 3,5$; $p=0,9$) pero si respecto al AR ($7,7 \pm 1,4$ vs $19,2 \pm 4,2$; $p=0,017$).

La expresión de MCP-1 en estas mismas células se presentó aumentada significativamente en todos los conejos respecto a los sanos. El grupo de conejos ARAT mostró un incremento de MCP-1 significativo respecto al grupo AT ($3,32 \pm 0,61$ vs $2,06 \pm 0,7$; $p=0,03$).

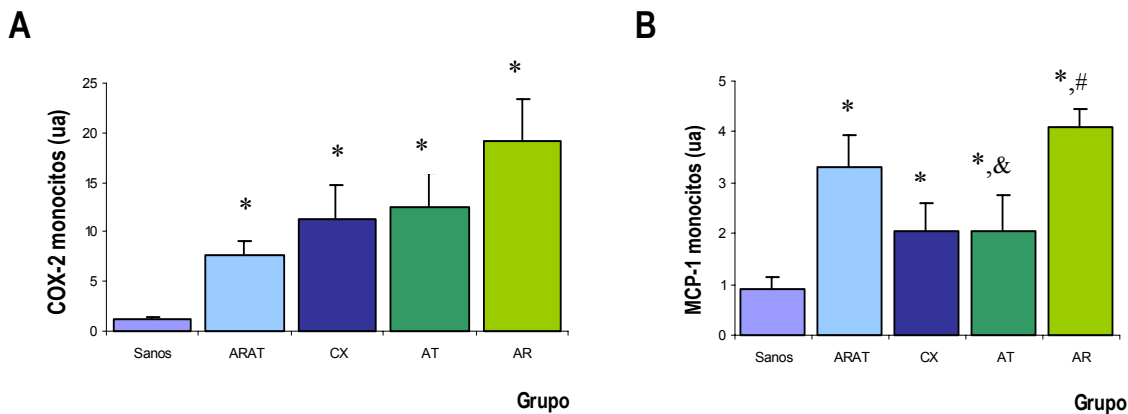


Figura 2: datos sobre la expresión de ARNm de A) COX-2 y B) MCP-1 en PBMC para analizar el estado de activación pro-inflamatorio de los distintos grupos de conejos. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT; #: $p<0.05$ vs AT. Número de conejos: sanos $n=20$, ARAT $n=18$; CX $n=14$; AT $n=16$, AR $n=14$.

3. ESTUDIO DE LA MEMBRANA SINOVIAL.

3.1 Estudio de la sinovitis.

El líquido sinovial y el suero de los pacientes que sufren AR presentan unas elevadas concentraciones de productos de la peroxidación lipídica. Se ha demostrado la presencia de macrófagos y de células grasas junto a depósitos de fibrina en la membrana sinovial de pacientes AR que sugieren hechos patogénicos análogos en la AR y en la aterosclerosis (Winyard et al, 1993).

La hiperplasia intimal de la membrana sinovial de los conejos valorada de 1 a 3 utilizando la escala de Krenn, no se ve modificada por el tratamiento respecto al grupo ARAT ($1,6 \pm 0,2$ vs $1,95 \pm 0,2$; $p=0,2$).

Otro parámetro evaluado de 1 a 3 es el infiltrado leucocitario, que no se modifica con el tratamiento con el CX respecto al grupo ARAT ($2,28 \pm 0,18$ vs $2,6 \pm 0,1$; $p=1$) pero si que presenta diferencias significativas en el caso del grupo AR ($1,91 \pm 0,2$ vs $2,6 \pm 0,1$; $p=0,032$).

La reacción estromal medida del 1 a 3, no presenta modificaciones con el tratamiento respecto al grupo ARAT ($2 \pm 0,23$ vs $2,45 \pm 0,18$; $p=0,1$).

El grado de sinovitis calculado por la suma de los tres parámetros anteriores, está incrementado significativamente en todos los grupos con animales con artritis reumatoide. El tratamiento con el inhibidor de COX-2 presenta una mejoría de la sinovitis respecto al grupo ARAT ($5,85 \pm 0,3$ vs $6,95 \pm 0,36$; $p=0,039$).

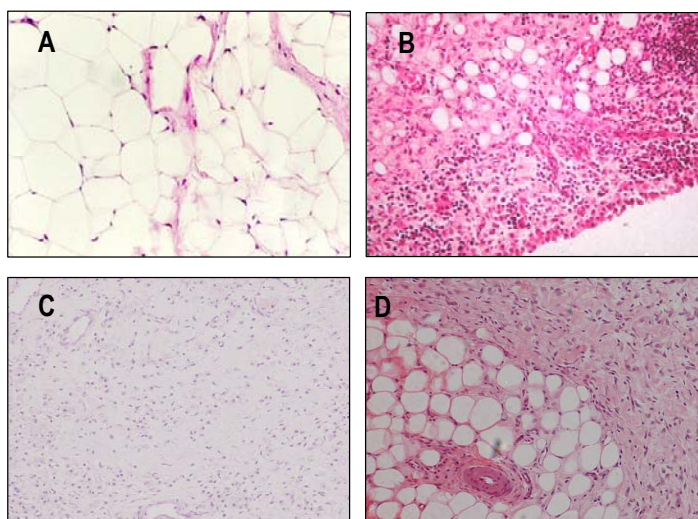


Figura 3: microfotografías de la membrana sinovial (20x): A) grupo sano, B) ARAT que presenta infiltrado en sávana y arquitectura similar a la reumatoide, C) tratado con CX y D) AR con depósito de fibrina e hiperplasia.

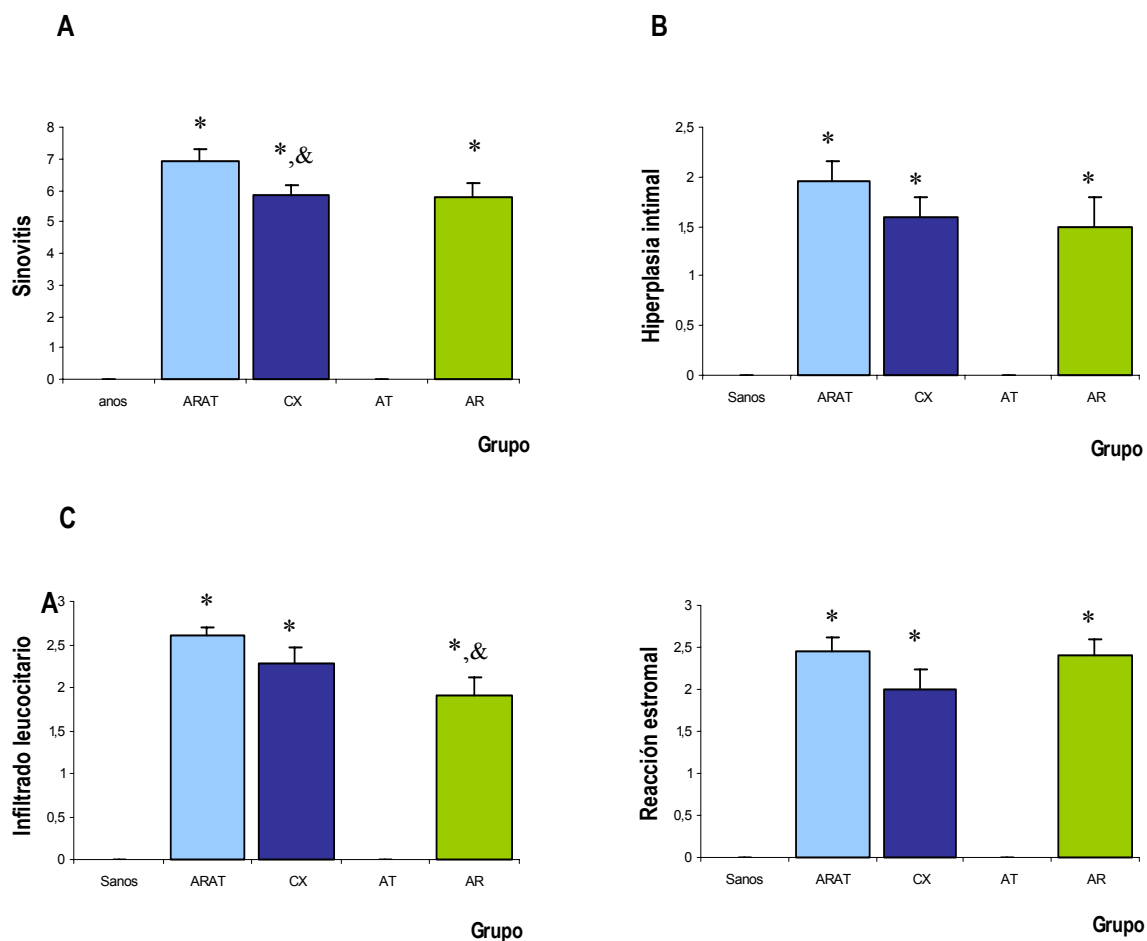


Figura 4: histopatología de la membrana sinovial. A) medida del grado de sinovitis, B) estudio de la hiperplasia intimal, C) medida del infiltrado leucocitario, D) datos de la reacción estromal. *: $p < 0.05$ vs sanos, &: $p < 0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 18$; CX $n = 14$; AT $n = 16$, AR $n = 14$.

3.2 Expresión de COX-2 en la sinovial.

Las membranas sinoviales de todos los grupos analizados presentaron una expresión de COX-2 significativamente superior respecto al grupo sano, exceptuando el grupo tratado con CX ($221,4 \pm 22$ vs $133,4 \pm 29$; $p=0,73$). El tratamiento con el inhibidor de COX-2 redujo también el valor frente al grupo de animales ARAT ($221,4 \pm 22$ vs $1424,5 \pm 103$; $p=0$). La expresión génica de COX-2 en el grupo AT también fue menor que la del grupo ARAT (519 ± 73 vs $1424,5 \pm 103$; $p=0$).

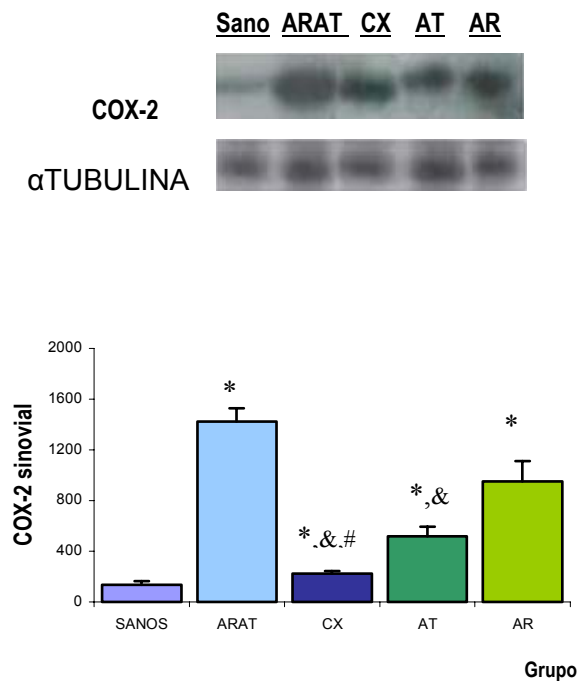


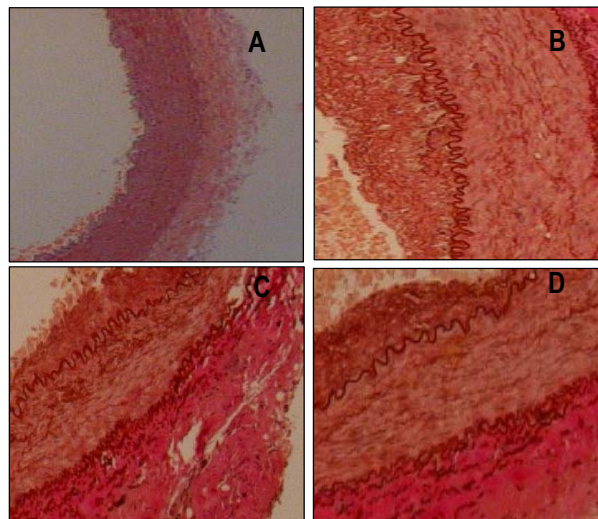
Figura 5: expresión proteica de COX-2 en la membrana sinovial de los distintos grupos de conejos por Western-blot. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT, #: $p<0.05$ vs AT. Número de conejos: sanos $n=20$, ARAT $n=18$; CX $n=14$; AT $n=16$, AR $n=14$.

4. ESTUDIO DE LA ARTERIA FEMORAL.

4.1 Análisis de las lesiones vasculares.

El cociente del grosor de la relación íntima/media fue significativo en todos los grupos que sufrieron daño en la arteria femoral respecto a los animales sanos, El grupo AT y el grupo ARAT no presentaron diferencias significativas ($2,56 \pm ,78$ vs $1,91 \pm 0,5$; $p=0,7$). El tratamiento con el coxib no alteró este parámetro respecto al grupo ARAT ($2,08 \pm 0,78$ vs $1,91 \pm 0,5$; $p=0,69$).

Los macrófagos son efectores inmunitarios innatos que son reclutados y activados por múltiples señales. En la aterosclerosis, el MCP-1 es la quimioquina implicada en el reclutamiento y se asocia a las LDLox en la activación de estos efectores. Una vez activados, los macrófagos expresan moléculas efectoras, como son las metaloproteinasas y el óxido nítrico, que son capaces de matar células y de degradar la matriz extracelular (Boyle et al, 2005). Todos los animales que sufrieron daño en la femoral presentaron presencia significativa de macrófagos. El grupo ARAT presentó un porcentaje de macrófagos en el área lesionada significativamente mayor que los conejos AT ($46,9 \pm 5,22$ vs $25,6 \pm 4,86$; $p=0,01$). El tratamiento con CX no modificó significativamente dicho parámetro.



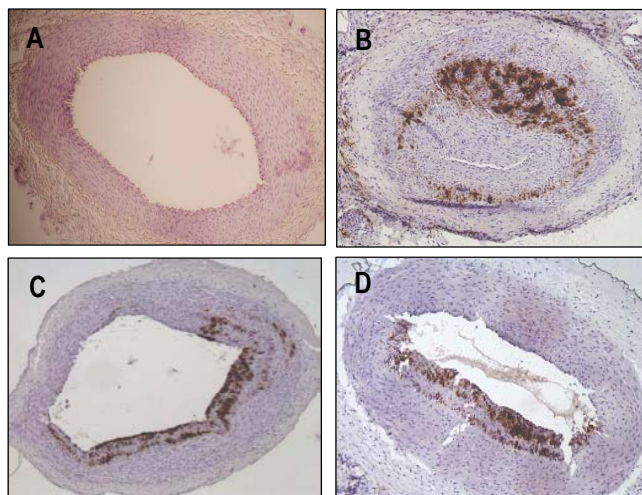


Figura 7: microfotografías de arteria femoral incubadas con RAM-11, anticuerpos para macrófagos (10x): A) animal del grupo sano, B) ARAT, C) tratado con CX y D) AT.

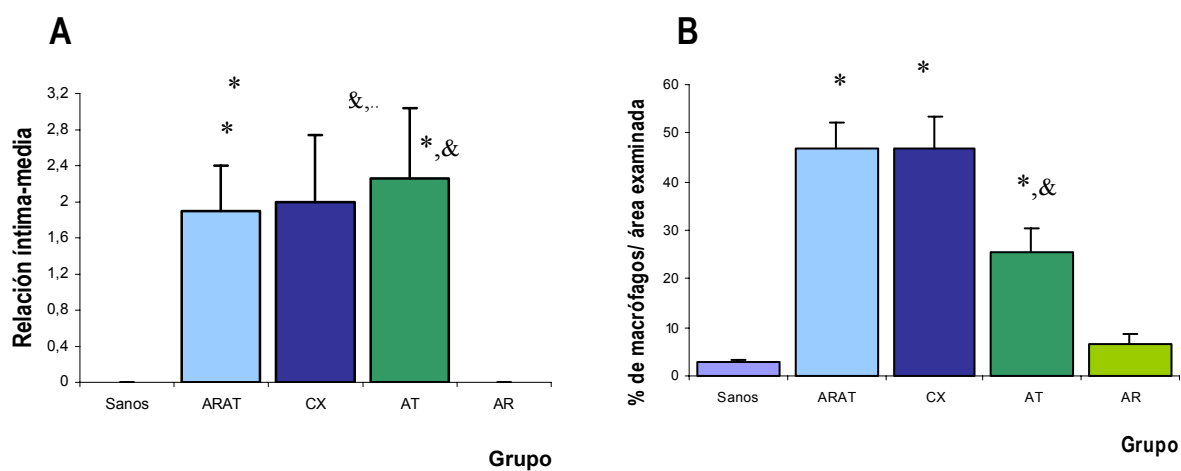


Figura 8: análisis de las lesiones vasculares. A) relación del grosor íntima/media del vaso, B) porcentaje de estenosis de las lesiones máximas, C) número de macrófagos por área examinada. *: $p < 0.05$ vs sanos, &: $p < 0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 15-18$; CX $n = 12-14$; AT $n = 16$, AR $n = 14$.

4.2 Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en la arteria femoral.

La expresión del mRNA para COX-2 se estudió en cada arteria individualmente mediante el método de *real time* PCR. Los conejos ARAT mostraron un incremento significativo de la expresión de COX-2 frente a los conejos sanos ($3,7 \pm 1,3$ vs $1 \pm 0,2$; $p=0,02$). El tratamiento con celecoxib supuso una disminución significativa de este parámetro respecto al modelo mixto ($1,2 \pm 0,34$ vs $3,7 \pm 1,3$; $p=0,05$). Los animales AT presentaron un nivel de COX-2 en la femoral significativamente menor que los ARAT ($1,1 \pm 0,1$ vs $3,7 \pm 1,3$; $p=0,003$).

Como las citoquinas son mediadores multipotenciales de la inflamación y de la inmunidad que pueden afectar a las funciones claves de las células de la pared vascular influyendo en el inicio, progreso y complicaciones de la lesión (Libby et al, 1995) se midió también la expresión de MCP-1 en la arteria femoral. El grupo ARAT presentó un valor significativamente superior respecto a los animales sanos ($6,6 \pm 1,7$ vs $1,1 \pm 0,03$; $p=0$) y a los animales AT ($6,6 \pm 1,7$ vs $1,6 \pm 0,4$; $p=0$). En el caso del grupo tratado con CX, el valor de la expresión de MCP-1 no fue significativa respecto al grupo ARAT ($3,6 \pm 0,8$ vs $6,6 \pm 1,7$; $p=0,6$).

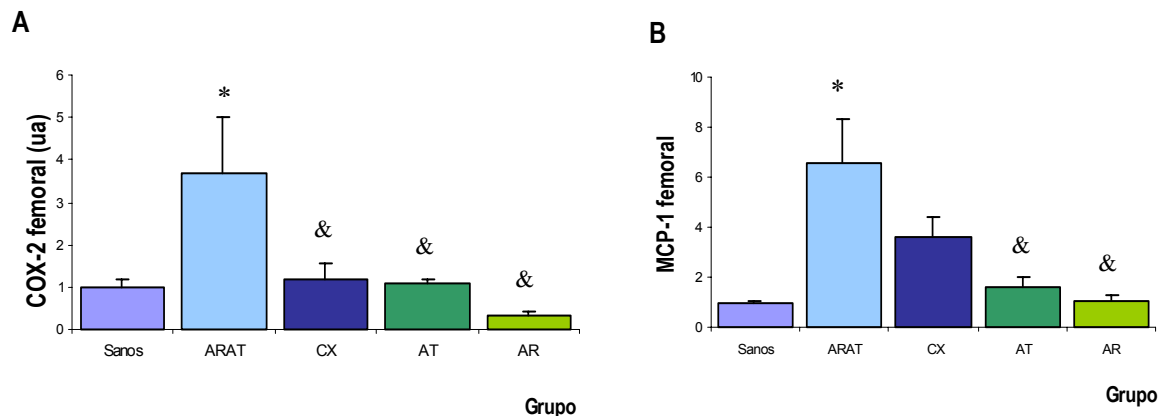


Figura 8: expresión de ARNm de A) COX-2 y B) MCP-1 de la femoral por PCR_Q de los diferentes grupos de conejos. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n=18-20$, ARAT $n=18$; CX $n=14$; AT $n=16$, AR $n=14$.

C.

4.3 Expresión de MMP-9 y COX-2 de la arteria femoral.

Se evaluó la expresión de la MMP-9 en las arterias femorales mediante Western-blot. El tratamiento con el inhibidor de COX-2 redujo la expresión de la metaloproteínasa casi a la mitad respecto al grupo ARAT (460 ± 44 vs 856 ± 35 , $p=0$), del mismo modo el grupo con la dieta y el daño vascular también presentaron un valor significativamente menor que el grupo ARAT (513 ± 27 vs 856 ± 35 , $p=0$). En cuanto al grupo que sufre la artritis crónica, la síntesis de MMP-9 fue significativamente mayor que el valor correspondiente al grupo sano (288 ± 27 vs 50 ± 18 ; $p=0,017$) y mucho menor que el grupo ARAT (288 ± 27 vs 856 ± 35 , $p=0,012$).

La expresión proteica de COX-2 medida en las femorales se incrementó en todos los casos, respecto al grupo de animales sanos, exceptuando el grupo AR (167 ± 12 vs $107,6 \pm 14$; $p=0,286$). El grupo tratado con celebrex presentó una menor síntesis de COX-2 que el grupo ARAT (2279 ± 305 vs 11690 ± 1108 ; $p=0,02$) y que el grupo AT (2279 ± 305 vs 4188 ± 470 ; $p=0,015$). En el caso del grupo AR no existieron diferencias significativas respecto al grupo ARAT (167 ± 12 vs 11690 ± 1108 ; $p=0,286$).

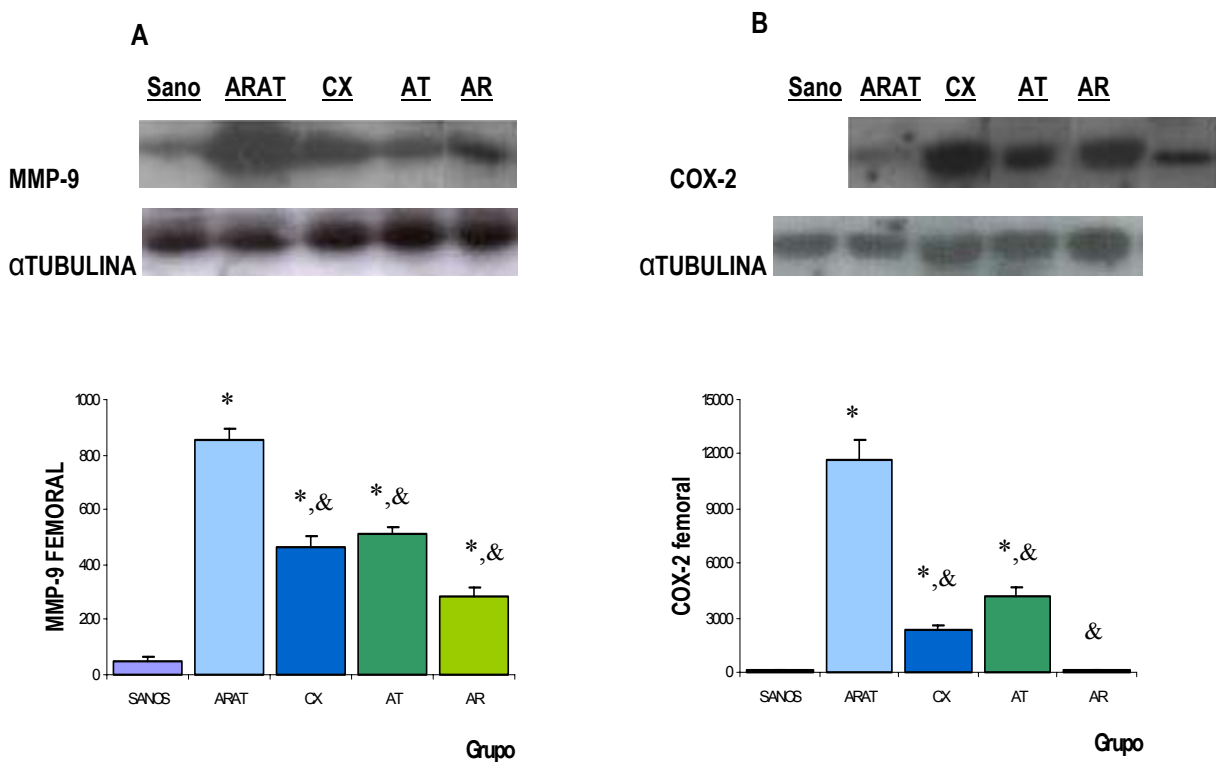


Figura 9: expresión proteica en la arteria femoral de los conejos estudiados. A) expresión de MMP-9, B) expresión de COX-2. *: $p < 0.05$ vs sanos, &: $p < 0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 18-20$, ARAT $n = 15-18$; CX $n = 12-14$; AT $n = 16$, AR $n = 14$.

5. ESTUDIO DE LA ARTERIA AORTA.

Se estudiaron 20 cortes secuenciales realizados con el microtomo de cada arteria aorta de los animales, en el caso de los animales sanos y de los animales que sufren AR crónica o aguda no aparecieron aortas con lesión mientras que los animales con dieta hipercolesterolémica presentaron lesiones en algunas arterias aorta ($p < 0,05$). Se observó un 56% de aortas lesionadas en el grupo ARAT (es decir 11 aortas lesionadas de 20 estudiadas) y un 25% en el grupo AT (4 aortas dañadas de 16 estudiadas). A pesar de estos datos, no existieron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,069$), aunque se intuye una tendencia a que la AR favorece a las lesiones vasculares.

El tratamiento con el inhibidor selectivo de COX-2 no disminuyó ni aumentó la frecuencia de las lesiones (8 aortas dañadas en 14 aortas estudiadas) respecto al modelo combinado ($p = 0,9$).

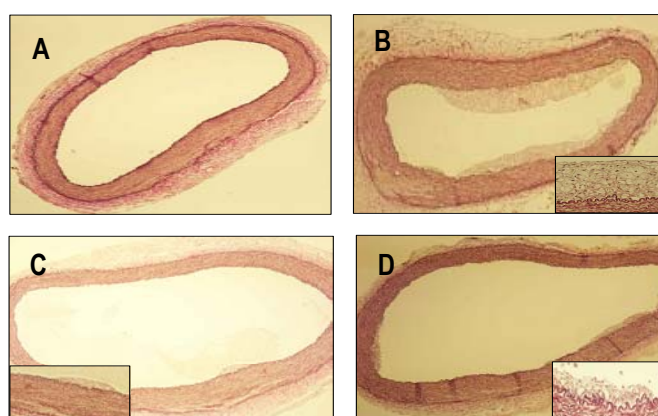


Figura 10: microfotografías de arterias aortas (10x) teñidas con orceína de animales: A) sanos, B) ARAT, C) CX y D) AT.

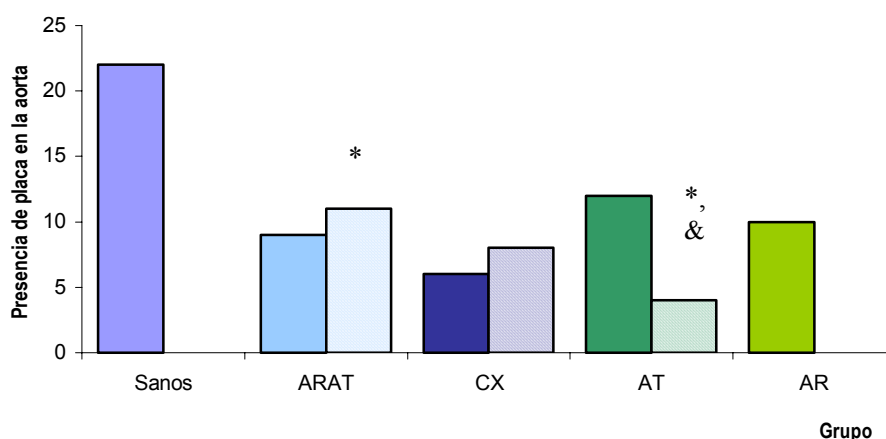


Figura 11: número de conejos que no presentan daño en la aorta (color liso) frente a los que si mostraron lesión (color rallado) dentro de cada grupo de conejos. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 18$; CX $n = 14$; AT $n = 16$, AR $n = 14$.

B.- ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DE DOS GLICOSAMINOGLICANOS, EL SULFATO DE GLUCOSAMINA Y EL CONDROITÍN SULFATO, SOBRE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y ATEROSCLEROSIS.

1. PARÁMETROS METABÓLICOS

El tratamiento con sulfato de glucosamina disminuyó el valor de los triglicéridos respecto al grupo ARAT de forma significativa ($p=0,038$) pero no modificó ninguno de los otros parámetros. El tratamiento con condroitín sulfato disminuyó significativamente el colesterol total y el valor de los triglicéridos respecto a los animales con ambas patologías ($p=0,011$; $p=0$ respectivamente).

Grupos	Colesterol total (mg/dl)	Col-HDL (mg/dl)	Ratio Col-HDL	Triglicéridos (mg/dl)
Sanos (n =20)	50±4	37±3	0,75±0,03	74±10
ARAT (n =18)	1861±68 *	18±2 *	0,01±0,001 *	89±11 *
SG (n =13)	1782±79 *	15±1,1 *	0,01±0,001*	69±5,7 &
CS ip (n = 9)	1596±55 *,&	17,8±1,1 *	0,01±0,0001 *	49,9±3,1 *,&
AT (n =16)	2402±180 *,&	21±2 *	0,01±0,001 *	205±13 *,&
AR (n =14)	89±8	17±2 *	0,21±0,03 *	93±17

Tabla 3: datos bioquímicos en el suero de los animales tratados con CS y con SG respecto a los animales controles y los animales con el modelo mixto. *: $p<0,05$ vs sanos, &: $p<0,05$ vs ARAT

Tanto la ganancia de peso como la creatinina sérica están significativamente incrementados en los tratamientos, con el SG y el CS, respecto a los sanos ($p=0$ para ambos tratamientos). En el caso de la glucosa en sangre los valores son significativamente menores para los tratamientos que para los animales sanos ($p=0$ para el SG, $p=0,05$ para el CS) En ningún caso los tratamientos permitieron modificar los valores del grupo de conejos con ambas enfermedades.

Grupos	Ganancia de peso(Kg.)	Creatinina (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)
Sanos (n =20)	1,07±0,03	1,1±0,1	253±6
ATR (n =18)	0,34±0,02 *	1,6±0,1 *	183±5 *
SG (n =13)	0,37±0,03 *	1,71±0,11 *	174±4 *
CS ip (n = 9)	0,32±0,04 *	1,51±0,03 *	168±4 *
AT (n =16)	1,42±0,08 *,&	1,7±0,1 *,&	257±3 &
AR (n =14)	0,66±0,03 *,&	1,1±0,06 &	176±4 *

Tabla 4: datos de la ganancia de peso durante el ensayo y de los valores de creatinina y glucosa en mg/dl en los animales tratados con CS y con SG respecto a los animales sanos, los ARAT, los AT y los AR. *: $p<0,05$ vs sanos, &: $p<0,05$ vs ARAT

2. INFLAMACIÓN SISTÉMICA

2.1 Medida de los reactantes de fase aguda en suero

En cuanto al nivel de los reactantes inflamatorios medidos en suero, el tratamiento con azúcares mejoró significativamente tanto los niveles de la interleuquina –6 como los niveles de la proteína C reactiva medidas en el suero de los conejos.

La IL-6 presentó valores significativamente superiores en el grupo ARAT respecto al sano ($396,3 \pm 27$ vs $159,9 \pm 21$; $p=0$). Los tratamientos con SG ($197,3 \pm 25$ vs $396,3 \pm 27$; $p=0$) y con CS ($173,4 \pm 17,5$ vs $396,3 \pm 27$; $p=0,002$) redujeron de forma significativa los valores de este parámetro respecto al grupo ARAT. Respecto al grupo sano, ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas.

La proteína C reactiva medida en suero se incrementó en todos los casos respecto a los animales sanos, el grupo ARAT presentó valores cien veces mayores frente al grupo de animales sanos ($138,7 \pm 21,7$ vs $0,36 \pm 0,04$; $p=0$). Los dos tratamientos disminuyeron dicho parámetro respecto al grupo con las dos enfermedades, en el caso de la glucosamina la reducción fue mucho más acusada (25 ± 7 vs $138,7 \pm 21,7$; $p=0$) que en el caso del GAG ($70,6 \pm 17,5$ vs $138,7 \pm 21,7$; $p=0,019$)

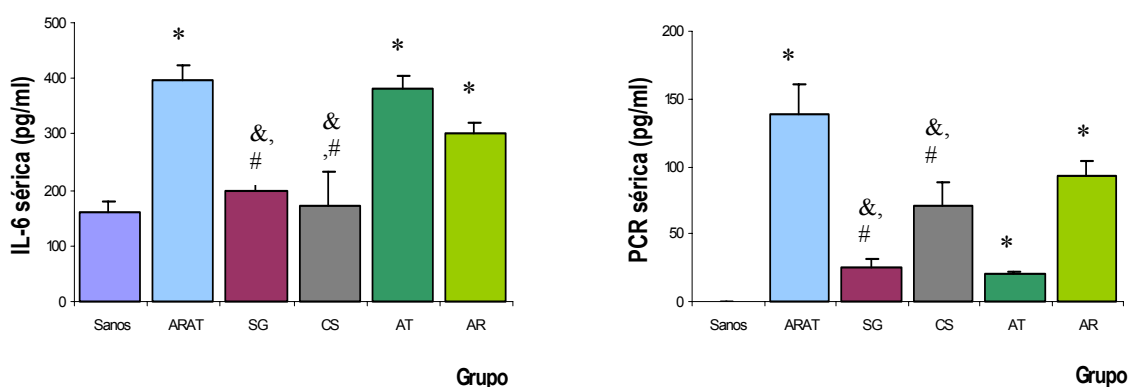


Figura 12: medida de la IL-6 sérica y de la PCR sérica en los animales tratados con CS y con SG respecto a los animales sanos, los ARAT, los AT y los AR. *: $p<0,05$ vs sanos, &: $p<0,05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n=18-20$, ARAT $n=15-18$, SG $n=13$, CS $n=9$, AT $n=14-16$, AR $n=14$.

2.2 Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en las células monocíticas circulantes

La medida de la ciclooxygenasa-2 en células mononucleares periféricas se redujo significativamente cuando se trató a los animales con SG ($4,14 \pm 2,6$ vs $7,8 \pm 1,4$; $p=0,05$) y CS ($5,25 \pm 3,3$ vs $7,8 \pm 1,4$; $p=0,04$). El tratamiento con CS presentó un valor de COX-2 superior a los animales sanos ($5,25 \pm 3,3$ vs $1,2 \pm 0,2$; $p=0,009$).

En relación a la expresión de MCP-1 en células mononucleares periféricas, el tratamiento con SG disminuyó de forma significativa dicha expresión frente al grupo ARAT ($1,4 \pm 0,5$ vs $3,32 \pm 0,6$; $p=0,073$), al igual que el tratamiento con CS ($1,75 \pm 0,4$ vs $3,32 \pm 0,6$; $p=0,081$). Ningún tratamiento presentó valores significativamente superiores respecto a los animales sanos.

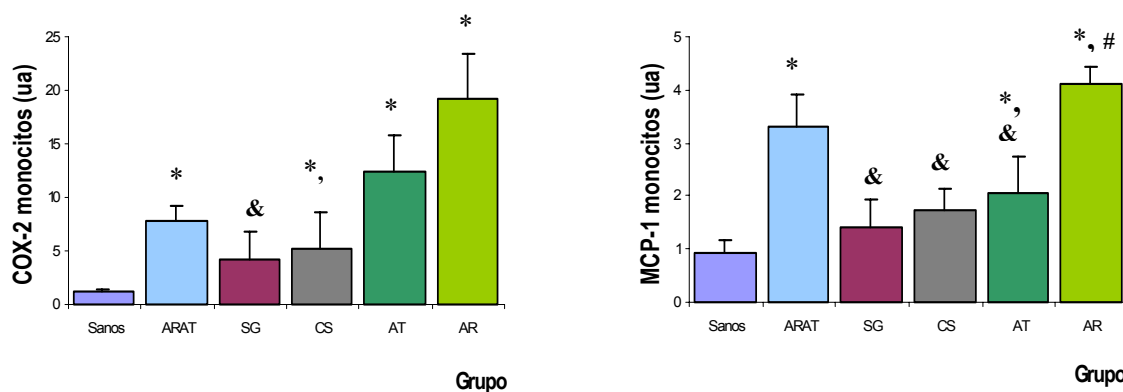


Figura 13: medida de la expresión del mRNA de COX-2 y de MCP-1 en PBMC por PCR a tiempo real.

*: $p<0,05$ vs sanos, &: $p<0,05$ vs ARAT. Número de conejos:: sanos $n=18-20$, ARAT $n=15-18$, SG $n=13$, CS $n=9$, AT $n=14-16$, AR $n=14$

3. ESTUDIO DE LA MEMBRANA SINOVIAL

3.1 Estudio de la sinovitis

El tratamiento con el SG disminuyó significativamente el grado de sinovitis respecto al grupo ARAT ($5,8 \pm 0,3$ vs $6,95 \pm 0,36$; $p=0,036$), al igual que el tratamiento con el CS ($5,22 \pm 0,64$ vs $6,95 \pm 0,36$; $p=0,018$).

La hiperplasia intimal no se vio modificada en el caso del tratamiento con el SG ($1,4 \pm 0,21$ vs $1,95 \pm 0,2$; $p=0,12$) pero si con el tratamiento con el CS ($1 \pm 0,28$ vs $1,95 \pm 0,2$; $p=0,015$) respecto a los animales con las dos enfermedades.

El infiltrado leucocitario no se alteró ni con el tratamiento con el SG ($2,15 \pm 0,19$ vs $2,6 \pm 0,1$; $p=0,1$) ni con el tratamiento con el CS ($2,5 \pm 0,5$ vs $2,6 \pm 0,1$; $p=0,1$) respecto al grupo ARAT.

La reacción estromal tampoco se modificó con el tratamiento en comparación con el grupo con la doble enfermedad, ni en el caso del tratamiento con SG ($2,18 \pm 0,22$ vs $2,45 \pm 0,18$; $p=0,2$) ni con el tratamiento con el GAG ($2,11 \pm 0,3$ vs $2,45 \pm 0,18$; $p=0,29$)

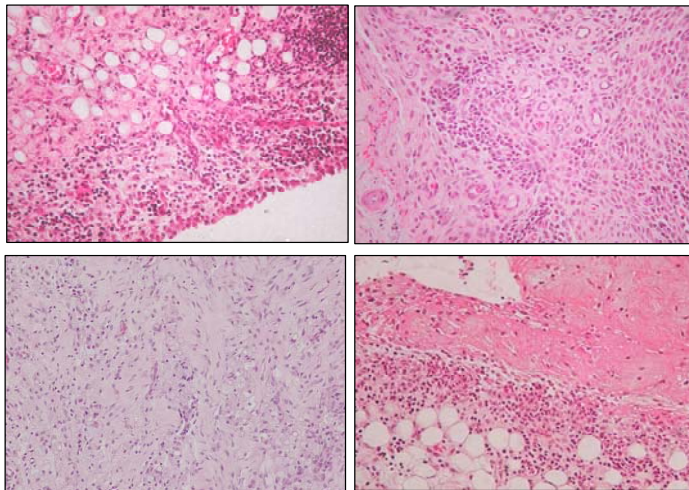


Figura 14: microfotografías de membranas sinoviales teñidas con hematoxilina-eosina (20x). A) conejo ARAT, B) conejo tratado con SG, C) conejo tratado con CS y D) conejo AR.

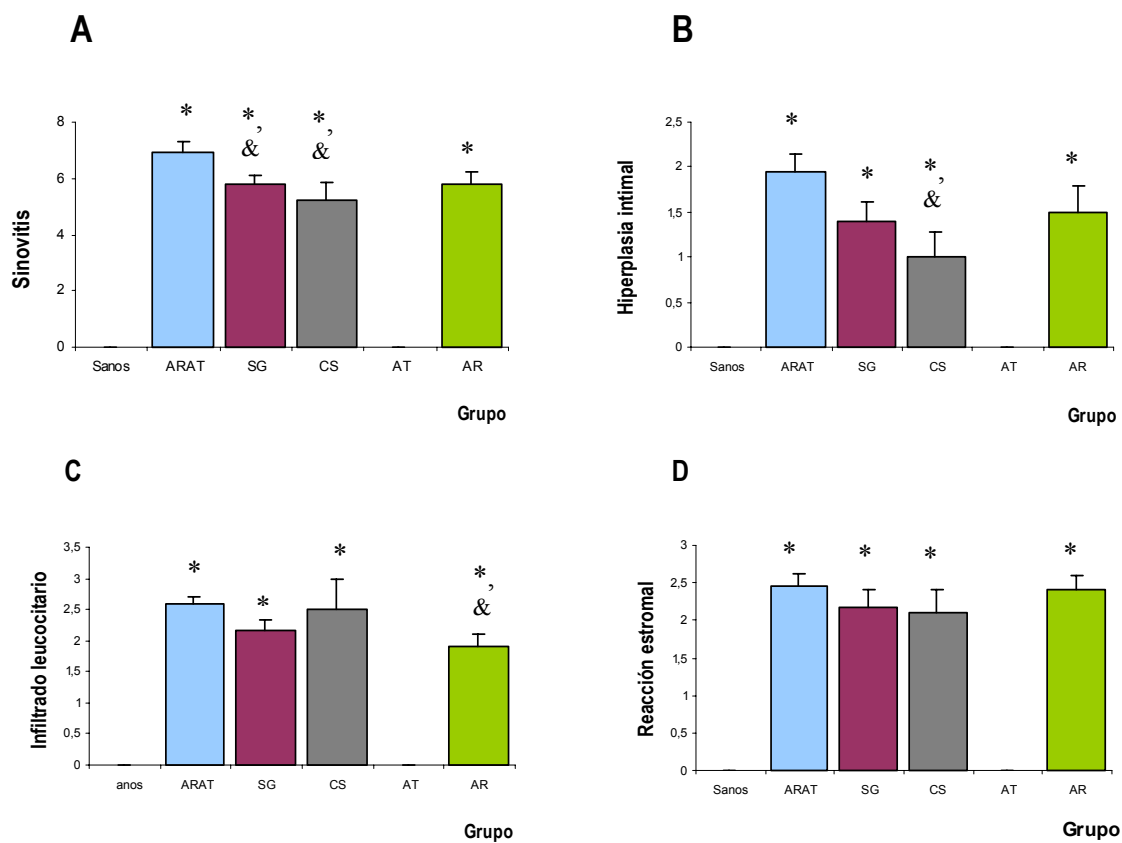


Figura 15: estudio histopatológico de la membrana sinovial de los diferentes grupos: grado de sinovitis (A), hiperplasia intimal (B), infiltrado leucocitario (C) y reacción estromal (D). *: $p < 0,05$ vs sanos, &: $p < 0,05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 18$, SG $n = 13$, CS $n = 9$, AT $n = 16$, AR $n = 18$.

3.2 Expresión de COX-2 en la sinovial

Todos los grupos analizados mostraron diferencias significativas respecto al grupo de animales sanos en la síntesis de COX-2 en la membrana sinovial medido por Western-blot. El tratamiento con SG disminuyó la síntesis de COX-2 respecto al grupo ARAT (545 ± 68 vs 1424 ± 103 ; $p=0$), lo mismo que el tratamiento con CS ($541,05 \pm 47,1$ vs $1424,5 \pm 103$; $p=0,001$).

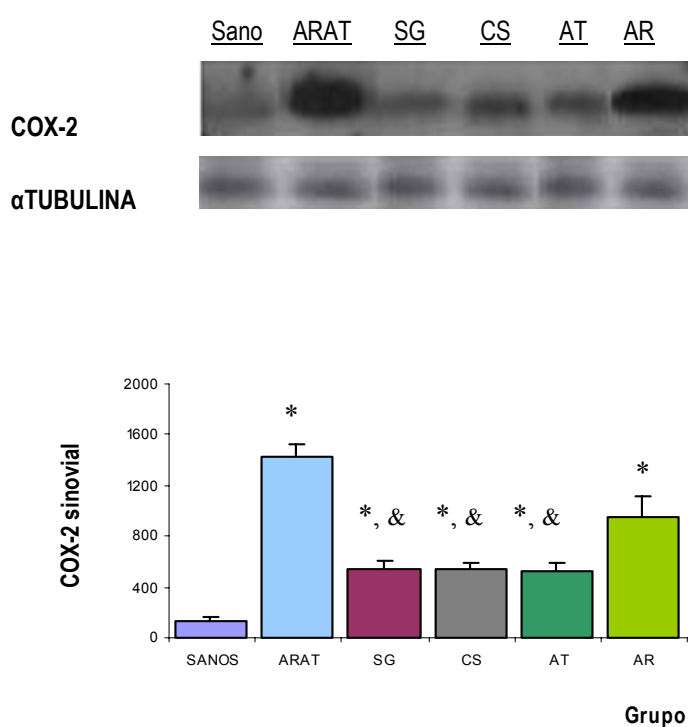


Figura 16: medida de la expresión de COX-2 en la membrana sinovial de los distintos grupos de conejos medido por Western-blot. *: $p<0,05$ vs sanos, &: $p<0,05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n=18-20$, ARAT $n=15-18$, SG $n=13$, CS $n=9$, AT $n=14-16$, AR $n=14$.

4. ESTUDIO DE LA ARTERIA FEMORAL

4.1 Análisis de las lesiones vasculares

Como se muestra en la gráfica, ambos tratamientos mostraron alteraciones en las arterias femorales a consecuencia del daño vascular, por lo que todos los datos obtenidos en este análisis se mostraron incrementados significativamente respecto a los animales sanos.

El valor de la medida del grosor íntima-media se redujo significativamente respecto a los animales ARAT tanto para el tratamiento con el SG ($1,1 \pm 0,2$ vs $1,9 \pm 0,5$; $p=0,03$) como para el tratamiento con el CS ($0,95 \pm 0,2$ vs $1,9 \pm 0,5$; $p=0,017$).

La presencia de macrófagos no se modificó respecto a los animales sanos ni para el tratamiento con el SG ($39,8 \pm 6,3$ vs $46,9 \pm 5,2$; $p=0,3$) ni para el tratamiento con CS ($33,2 \pm 10,1$ vs $46,9 \pm 5,2$; $p=0,15$).

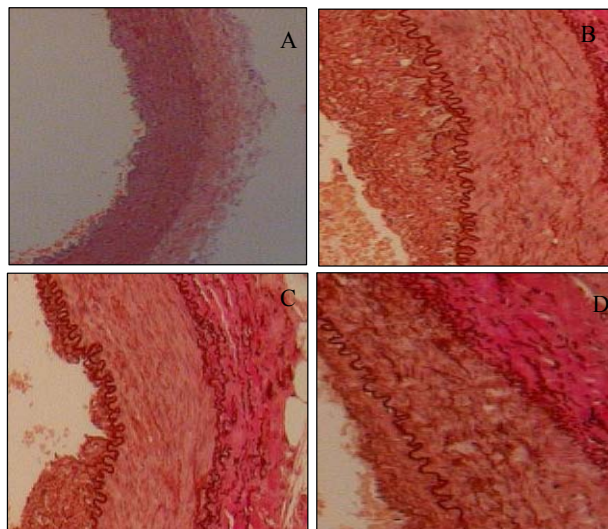


Figura 17: microfotografías de las arterias femorales de conejos teñidas con orceína (10x). A) conejo sano, B) conejo ARAT, C) conejo tratado con SG y D) conejo tratado con CS.

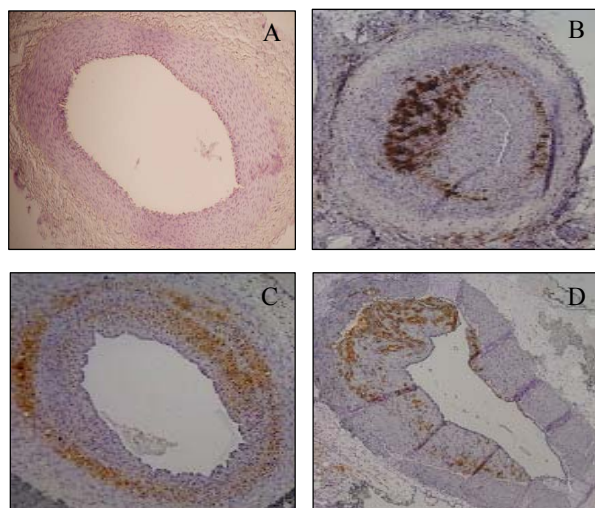


Figura 18: microfotografías de arterias femorales teñidas con el anticuerpo antimacrófagos RAM-11. A) conejo sano, B), conejo ARAT C) conejo tratado con SG y D) conejo tratado con CS

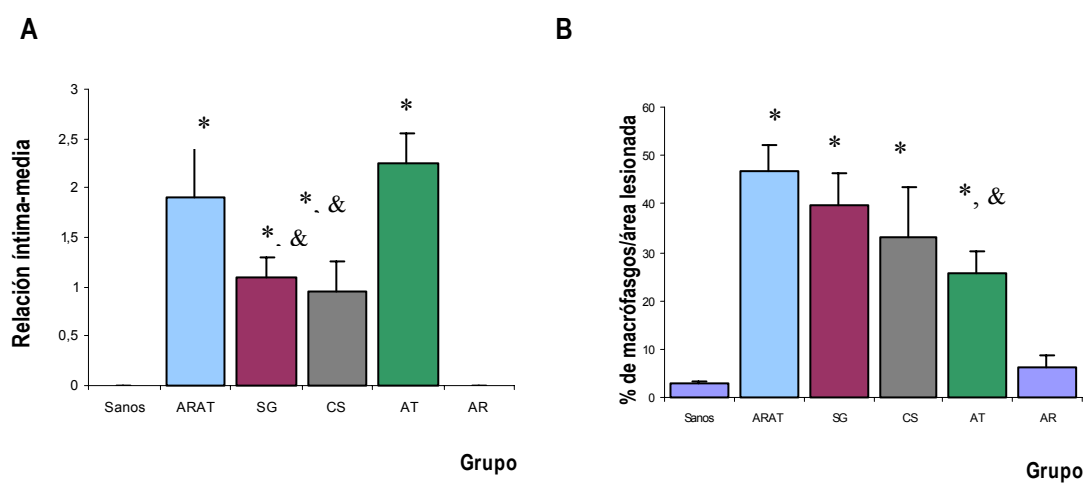


Figura 19: cuantificación morfométrica de la lesión: A) relación íntima-media, B) porcentaje de macrófagos por área lesionada de los distintos grupos de animales. *: $p < 0,05$ vs sanos, &: $p < 0,05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 18$, SG $n = 13$, CS $n = 9$, AT $n = 16$, AR $n = 18$.

4.2 Medida de la expresión del ARNm de COX-2 y de MCP-1 en la arteria femoral

En el caso de los animales que se trataron con sulfato de glucosamina, la expresión de la enzima inducible COX-2 en la femoral medida por *real time* PCR se disminuyó significativamente respecto al modelo mixto ($1,03 \pm 0,19$ vs $3,7 \pm 1,3$; $p=0,002$). Ocurre lo mismo para el tratamiento con el GAG respecto los animales ARAT ($0,77 \pm 0,2$ vs $3,7 \pm 1,3$; $p=0,005$). Además estos valores de expresión para los tratamientos no mostraron diferencias significativas frente a los animales sanos.

El valor de la expresión de MCP-1 en la femoral también se redujo de modo significativo en los animales tratados con sulfato de glucosamina ($2,7 \pm 0,3$ vs $6,6 \pm 1,7$; $p=0,01$) y condroitín sulfato ($2,04 \pm 0,4$ vs $6,6 \pm 1,7$; $p=0,01$) respecto al grupo ARAT. En este parámetro, el tratamiento con SG mostró valores significativamente incrementados respecto a los animales sanos ($2,7 \pm 0,3$ vs $0,99 \pm 0,03$; $p=0,01$) mientras que el tratamiento con CS no presentó diferencias frente al grupo de animales sanos ($2,04 \pm 0,4$ vs $0,99 \pm 0,03$; $p=1,5$).

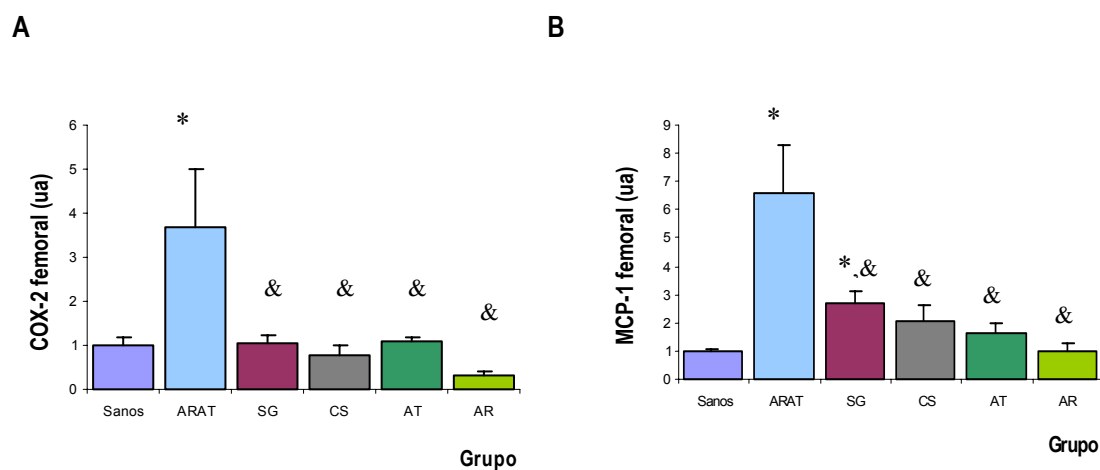


Figura 20: expresión de ARNm de A) COX-2 y B) MCP-1 de la femoral por PCR_Q de los diferentes grupos de conejos. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n=18-20$, ARAT $n=15-18$, SG $n=13$, CS $n=9$, AT $n=14-16$, AR $n=14$.

4.3 Expresión de MMP-9 y COX-2 de la arteria femoral

La expresión de MMP-9 fue significativa en todos los casos respecto a los animales sanos. El tratamiento con SG disminuyó dicho parámetro significativamente respecto al grupo ARAT (388 ± 57 vs 856 ± 35 ; $p=0$). En el caso del GAG, la disminución fue marginalmente significativa (741 ± 69 vs 856 ± 35 ; $p=0,09$).

Para la expresión de COX-2 en la arteria femoral, existe un incremento significativo respecto a los sanos tanto para el tratamiento con SG (4059 ± 355 vs $107,6 \pm 14$; $p=0,001$) como con CS (4683 ± 622 vs $107,6 \pm 14$; $p=0,001$). Para el nivel de COX-2, los tratamientos con SG (4059 ± 355 vs 11690 ± 1108 ; $p=0,001$) y con CS (4683 ± 622 vs 11690 ± 1108 ; $p=0,001$) redujeron el parámetro de forma significativa.

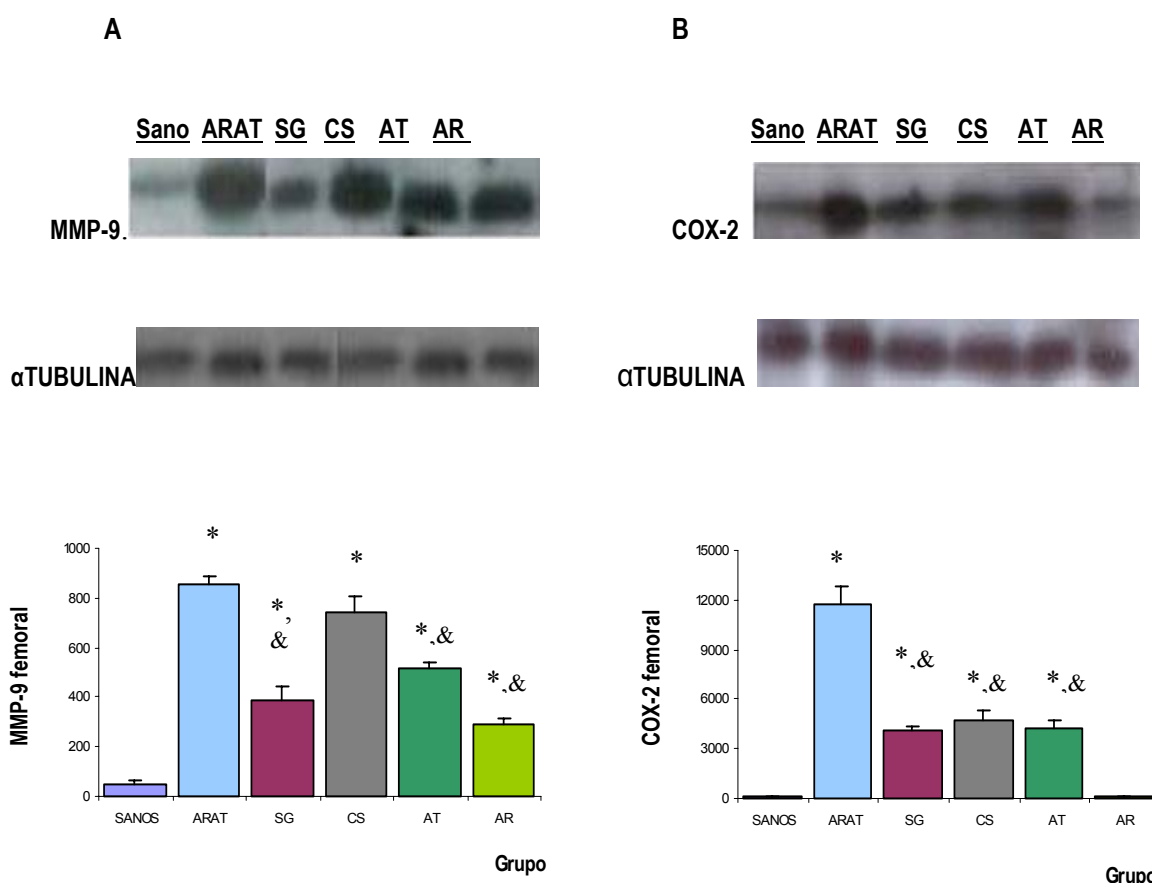


Figura 21: expresión proteica en la arteria femoral de los conejos estudiados. A) expresión de MMP-9, B) expresión de COX-2. *: $p<0.05$ vs sanos, &: $p<0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n=18-20$, ARAT $n=15-18$, SG $n=13$, CS $n=9$, AT $n=14-16$, AR $n=14$.

5. ESTUDIO DE LA ARTERIA AORTA

Como ya se ha descrito, se estudiaron 20 cortes secuenciales realizados con el microtomo de cada arteria aorta de los animales. Los animales sanos y de los AR no presentaron aortas con lesión. Se observó un 56% de aortas lesionadas en el grupo ARAT y un 25% en el grupo AT. En el caso del grupo tratado con SG, ninguno de los 13 animales analizados presentó daño en la arteria aorta. Sólo uno de los 9 animales del grupo CS presentó lesión en la aorta, es decir, el 11%.

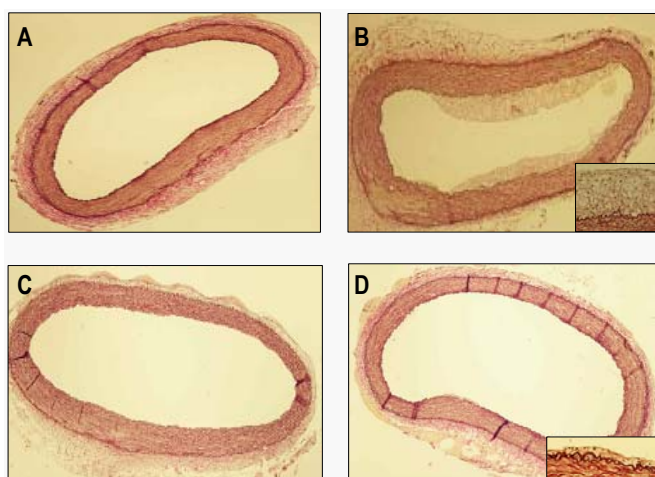


Figura 22: microfotografías de arterias aortas teñidas con orceína (10x). A) conejo sano, B) conejo tratado con ARAT, C) conejo tratado con SG y D) conejo tratado con CS.

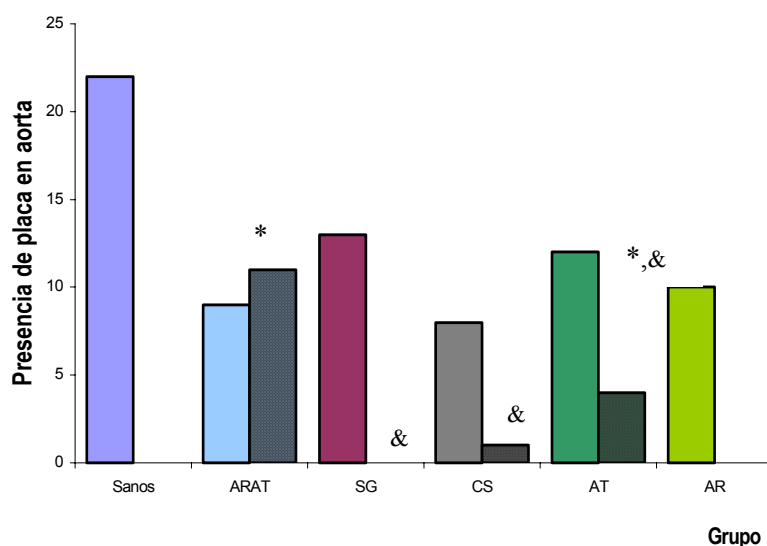


Figura 23: número de conejos que no presentan daño en la aorta (color liso) frente a los que si mostraron lesión (color rallado) dentro de cada grupo de conejos. *: $p < 0.05$ vs sanos, &: $p < 0.05$ vs ARAT. Número de conejos: sanos $n = 20$, ARAT $n = 18$, SG $n = 13$, CS $n = 9$, AT $n = 16$, AR $n = 18$.

V. DISCUSIÓN

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica de larga evolución y de etiología desconocida, que disminuye la calidad y la esperanza de vida, siendo las enfermedades cardiovasculares responsables de casi la mitad de los fallecimientos en la AR. Varios estudios han demostrado un aumento en el riesgo de aterosclerosis y ataques cardíacos en pacientes con AR [Goodson et al., 2002]. Se sabe que los procesos que conducen a la inflamación crónica y a la respuesta inmune observados en la AR comparten características con aquellos que participan en la AT, por lo que se sospecha que en los pacientes con AR existe una AT acelerada [Roman et al., 2006].

Los marcadores sistémicos de inflamación, incluso en valores más bajos que los observados en la AR, son predictores independientes de acontecimientos cardiovasculares. Cada vez son más los autores que respaldan la hipótesis de que la AT es una enfermedad inflamatoria crónica dinámica. Este concepto de aterogenia inflamatoria se basa en la composición de las placas de las lesiones coronarias inestables, con abundantes moléculas inflamatorias y de células inmunes que actúan erosionando la capa de colágeno y separando material ateromatoso de la placa desde la sangre [Sattar et al., 2003]. Las interacciones celulares en la AT no presentan diferencias con las que se producen en la membrana sinovial de la AR. La AR se caracteriza por la activación de las células sinoviales mediada por citoquinas, moléculas de adhesión y factores de coagulación, dando lugar a una hiperplasia de la membrana sinovial, y la activación de los linfocitos y macrófagos, que provocan la erosión del cartílago y del hueso, que es reemplazado por el tejido fibroso (pannus) [Ross et al., 1999; Nakayamada et al., 2005].

Se han expuesto dos razones para esta AT acelerada: la inflamación sistémica característica de la AR y la acumulación de factores de riesgo clásicos asociados a la AR, que recuerdan al síndrome metabólico (SM) [Stevens et al., 2005]. Los factores que aceleran la AT en los pacientes con AR son: la activación del endotelio vascular a través del complemento mediada por el factor reumatoide, un marcado aumento de citoquinas proinflamatorias (como la IL-6, que favorecen el reclutamiento celular a nivel de la pared de los vasos), la presencia de altos niveles séricos de PCR (capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión sobre la pared vascular y mediar la activación del complemento), el aumento en suero de sustancia amiloide A (que tiene efectos aterogénicos sobre plaquetas y leucocitos) y el desarrollo de un estado protrombótico. Además, debe tenerse en cuenta que el tratamiento con esteroides que reciben estos pacientes condiciona un perfil lipídico aterogénico, que desencadena un descenso del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-co) y un aumento del LDL, lipoproteína (a) y homocisteína; a la vez que se incrementan tres factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial y la obesidad. Estudios realizados en un grupo de pacientes con AR sin evidencias de factores de riesgo para AT, mostraron valores elevados de PCR, de la velocidad de sedimentación eritrocítica, de la media del grosor íntima/media y del título de anticuerpos anti-LDLox. Además, éstos dos últimos se correlacionaron positivamente. Los anticuerpos anti-LDL parecen estar asociados con el grado de AT carotídea en pacientes con AR: posible nexo de unión entre enfermedad inflamatoria y AT acelerada [Wata et al., 2005]

Como se ha dicho, la inflamación juega un importante papel en el inicio y progreso de la AT y en el desarrollo de los eventos ateroscleróticos. Se considera que muchas moléculas, como las citoquinas proinflamatorias (importantes contribuidores a la patología de muchas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas) y las quimioquinas, son mediadores comunes entre la AT y la AR. La concentración de la IL-6 y de su producto hepático, la PCR, refleja la intensidad de la inflamación de una placa oculta y de su vulnerabilidad para la ruptura. El MCP-1 y la IL-8 juegan un papel crucial en el inicio de la AT reclutando monocitos/macrófagos en la pared del vaso lo que promueve las lesiones ateroscleróticas y la vulnerabilidad de la placa. La modulación terapéutica de estas citoquinas inflamatorias son útiles en la prevención de la AT y de futuros eventos cardiovasculares [Ito et al., 2003]. Datos recientes muestran que el 30% de los infartos se producen sin rotura de placa y por la formación del trombo sobre una placa con poco contenido graso y que estenosa mucho la luz del vaso [Fuster et al., 2000]. Hecho que sugiere la existencia de factores patogénicos añadidos a la propia vulnerabilidad de la placa en sí, y que probablemente provengan de elementos presentes en la sangre circulante. En los últimos años, ha cobrado un mayor interés la búsqueda de marcadores inflamatorios en suero como la PCR que está asociada con el fenómeno de inestabilidad que conduce al evento isquémico [Álvarez García et al., 2003]. Otros autores han descrito que la actividad de unión de NF- κ B está incrementada en pacientes con angina inestable [Ritchie et al. 1998].

1.- ANÁLISIS DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSIS ASOCIADA A ARTRITIS CRÓNICA

1.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos

Trabajos anteriores demostraron que la dieta hipercolesterolémica induce la acumulación de colesterol exógeno y causa un marcado incremento de los niveles lipídicos, a excepción de los niveles de HDL. En el caso de los conejos que ingieren esta dieta, al no ser capaces de aumentar la excreción de esteroides, sufren un aumento de los niveles de lipoproteínas aterogénicas en sangre y su permanencia en la circulación durante largos periodos favorece al desarrollo de la lesión [Chen et al., 1999]. La hipercolesterolemia se ha asociado a la generación de LDLox y ROS en la pared vascular y en la circulación sanguínea. Ambos se relacionan con la disfunción endotelial (particularmente en las zonas de estrés) y con la activación de los monocitos/macrófagos en la capa media rica en lípidos. En el vaso, las células endoteliales modulan la permeabilidad de la membrana vascular para el paso de LDL y las HDL protegen a las LDL de la oxidación. En modelos animales con hipercolesterolemia, los antioxidantes pueden disminuir el tamaño de la lesión y reducen las estrías grasas en los modelos con primates [Sambola et al., 2003]. Las partículas de HDL son altamente heterogéneas en estructura, metabolismo intravascular y actividad antiaterogénica. Las partículas pequeñas y densas de HDL tienen actividad antioxidante pero esto se ve comprometido en condiciones de dislipemia aterogénica. La deficiencia funcional de las HDL se relaciona con la reducción de la concentración de las HDL-colesterol y de la

alteración del metabolismo y estructura de las HDL. Los bajos niveles de HDL-colesterol se asocian con la estructura y composición anormal de las HDL, ricas en triglicéridos y en proteína amiloide A.

Se ha aceptado que la AT es un desorden inflamatorio crónico del árbol arterial asociado a varios factores de riesgo. Desde las fases iniciales hasta la ruptura de la placa, un bajo grado de inflamación parece tener un papel patogénico. Por los resultados obtenidos en esta tesis, el grupo AT presenta características semejantes a las descritas en el síndrome metabólico: aumento de triglicéridos, reducción de las HDL unidas a colesterol, incremento del peso y aumento de los niveles séricos de los reactantes de fase aguda. La deficiencia del número y función de las partículas de HDL característica de los pacientes con síndrome metabólico, favorece a la AT acelerada [Kontush et al., 2006]. Además estos pacientes presentan elevadas cantidades de LDL de estructura densa y pequeña que se correlacionan de forma negativa con los niveles de HDL en plasma y de forma positiva con la concentración de triglicéridos. Estas partículas se asocian también con el síndrome metabólico y con el incremento de riesgo a padecer un evento cardiovascular [Rizzo et al., 2006]. En cuanto a la ganancia de peso, el tejido adiposo produce la IL-6 y el TNF- α , estas citoquinas pueden ser la base de varios de los componentes del síndrome de resistencia a insulina, de la disfunción endotelial y, potencialmente, del riesgo cardiovascular (independientemente de sus efectos sobre la resistencia a la insulina y sobre el metabolismo lipídico). Estudios realizados en hombres con sobrepeso sometidos a una dieta baja en grasa y muy baja en carbohidratos, mostraron una reducción significativa de IL-6, PCR, TNF- α y de ICAM-1. En otros estudios, la producción de MCP-1 en adipocitos aislados, se redujo después de que sujetos con obesidad mórbida redujeran peso. Parece que la obesidad, en particular la obesidad visceral, está asociada con un bajo grado de inflamación [Kaperonis et al., 2006]. Los altos niveles de la IL-6 pueden explicarse con su importante papel en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, siendo liberada tanto por las células espumosas como por el endotelio dañado. Además, no sólo contribuye a eventos tempranos como la migración de células mononucleares regulando la expresión de MCP-1 y de moléculas de adhesión sino que permite la progresión de la placa madura [Libby et al., 1995]. La concentración de la IL-6 y de su producto hepático, la PCR, refleja la intensidad de la inflamación de una placa oculta y de su vulnerabilidad para la ruptura. Nuestros resultados se corresponden con los datos obtenidos en pacientes con enfermedad CV, que presentan valores de IL-6 y de PCR incrementados y que se correlacionan con la severidad de la enfermedad [Ito et al., 2003].

Por otro lado, el cuadro clínico desarrollado por los conejos ARAT es similar al descrito para un Síndrome de Inflamación-Caquexia, caracterizado por una pérdida de peso, reducción de los niveles de col-HDL suero y altos niveles séricos de reactantes de fase aguda. La caquexia es la alteración grave del estado nutricional, que ocurre durante una enfermedad crónica o trastorno emocional, dando lugar a una marcada pérdida de peso. La PCR, medida en forma ultrasensible, se encuentra aumentada en los conejos AT, actuando como un reactante y un marcador de inflamación de la pared vascular, y en los conejos AR, actuando como un

marcador de la inflamación sinovial. En un grupo de pacientes con AR sin evidencias de factores de riesgo para AT, se encontraron elevados valores de PCR, de sedimentación eritrocítica, de cociente del grosor íntima-media y del título de anticuerpos anti-LDLox, estos dos últimos se correlacionaron positivamente. Los anticuerpos anti-LDL parecen estar asociados con el grado de AT carotídea en pacientes con AR: posible nexo de unión entre enfermedad inflamatoria y AT acelerada [Wata et al., 2005]. Pero, como ya se ha explicado, la PCR es principalmente un marcador de la inflamación sistémica que refleja una reacción inflamatoria de bajo grado atribuible a una inflamación crónica, lo que permite pensar que los conejos ARAT presentan mayor inflamación a nivel sistémico que los animales con sólo una de las enfermedades [Libby et al., 2002]. Datos previos han determinado que los niveles séricos de PCR ofrecen un fiel reflejo del proceso inflamatorio subyacente, ya que se correlaciona con otros marcadores como son: los niveles séricos de ICAM-1, IL-6, fibrinógeno, activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno y factor VII [Steffens et al., 2004; Roman et al., 2005]. Se ha demostrado también que en la sinovial inflamada, las citoquinas derivadas de macrófagos como IL-6 están altamente expresadas, lo que explicaría los altos niveles presentes en el suero de los conejos con AR [Ito et al., 2003].

1.2. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2

La enzima COX-2 y el MCP-1 de los monocitos de sangre periférica juega un importante papel en el síndrome coronario agudo [Wong et al., 2001], por lo que realizamos el estudio de ambos parámetros de la sangre de los conejos

El MCP-1 es una proteína que en estudios *in vitro* atrae monocitos, linfocitos T de memoria y células *natural killer*. Se expresa en enfermedades caracterizadas por infiltrados celulares mononucleares como en la AT y la AR, además de promover la angiogénesis. En nuestro modelo, la expresión de MCP-1 en PBMC está muy elevada en todos los grupos respecto a los sanos y es muy superior en el grupo AR frente a los ARAT y AT. Sin embargo el valor de MCP-1 en la femoral es muy superior en el grupo ARAT respecto al AT y éste respecto al AR.

Evidencias experimentales y clínicas sugieren que la COX-2 contribuye a la formación de la placa y que existe un aumento en la actividad de la COX-2 en los monocitos y la producción de la PGE₂ en individuos asintomáticos con aterosclerosis subclínica [Paramo et al., 2006]. Recientemente se ha demostrado que los pacientes con aterosclerosis carotídea presentan un aumento de la activación de NF-κB y un incremento significativo de la expresión del mRNA de las COX-2 en las PBMC respecto a los controles sanos. Por tanto, la expresión de estas proteínas estaría ya aumentada en los monocitos antes de entrar en la pared vascular. La patogenia de la enfermedad cardiovascular incluye una serie de pasos: la exposición a factores de riesgo cardiovasculares, la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la ruptura de la placa [Martín-Ventura et al., 2004]. La expresión de la

COX-2 en PBMC está aumentada en todos los grupos respecto a los sanos, y es significativamente mayor en el grupo AR que en el ARAT. En la AR crónica, la COX-2 se localiza en el endotelio en expansión, en los macrófagos y en los fibroblastos sinoviales de la articulación inflamada. Los inductores angiogénicos proceden de macrófagos y de la línea sinovial [Iñiguez et al., 2003].

1.3. Estudio de las lesiones sinoviales

Nuestros resultados, según la escala de Krenn [Krenn et al, 2002], mostraron una hiperplasia intimal difusa para los conejos con AR y de alta densidad celular para el grupo ARAT y la reacción estromal se sitúa en un nivel de hipervascularización y de fibrosis difusa en ambos grupos, característica de la artritis crónica y que es proporcional a la gravedad de la lesión. En cuanto al infiltrado leucocitario, el grupo ARAT presentó focos leucocitarios múltiples y organizados y el grupo AR focos leucocitarios amplios.

Encontramos en nuestro estudio que las membranas sinoviales presentaron una sobreexpresión proteica de la COX-2 en todos los grupos respecto a los animales sanos. El grupo ARAT mostró valores superiores a los conejos AT. Se sabe que en la AR crónica, la COX-2 se localiza en el endotelio en expansión, en los macrófagos y en los fibroblastos sinoviales de la articulación inflamada y que los inductores angiogénicos proceden de los macrófagos y de la línea sinovial [Iñiguez et al., 2003].

1.4. Estudio de las lesiones arteriales

En las arterias ateroscleróticas humanas se expresa además del MCP-1, la COX-2 co-localizada con MMP-9, mientras que las arterias sanas sólo expresan la COX-1 [Hernández-Presa et al., 2002], nosotros evaluamos dichos parámetros en las arterias femorales de los distintos grupos de conejos.

El MCP-1 es sintetizado in vivo por células de la pared vascular y su expresión está controlada principalmente por el factor de transcripción nuclear NF- κ B [Gu et al., 1997; Kim et al., 2005]. Nuestros datos mostraron una expresión génica del MCP-1 en la arteria femoral aumentada de forma significativa en todos los grupos respecto al grupo control sano. El grupo ARAT presentó una mayor expresión que el grupo AT. Otros estudios demostraron que en estadios tempranos de la aterosclerosis en los conejos hipercolesterolémicos, el MCP-1 se expresa por macrófagos y por células del músculo liso contribuyendo al desarrollo de la estría grasa [Chen et al., 1999]. Trabajos recientes han demostrado que los monocitos promueven la AT en conejos Nueva Zelanda, pero no lo hacen ni los granulocitos ni los linfocitos T [Hoefer et al., 2005]. Las LDLox inducen la producción del MCP-1 en las células de la pared vascular, en células endoteliales y células del músculo liso, de este modo se está considerando al MCP-1 como un nexo entre las lipoproteínas oxidadas y el reclutamiento de las células espumosas. Además, el MCP-1 es capaz de activar al factor tisular y contribuye a los aspectos trombóticos de

las lesiones ateroscleróticas avanzadas, la trombina producida activa un feed-back positivo para la síntesis adicional del MCP-1. El ARN del MCP-1 se induce rápidamente en la capa media arterial de modelos animales de daño arterial normolipémicos e hiperlipémicos, por lo que se ha propuesto que la inducción del MCP-1 no se relacione siempre con la acumulación de macrófagos. De este modo, a pesar de que el MCP-1 reclute macrófagos a las zonas de daño arterial, éste no es suficiente para asegurar el desarrollo de una lesión rica en macrófagos [Charo et al., 2004].

Como se ha explicado ya, la COX-2 es la forma inducible de la ciclooxigenasa y está implicada en la respuesta inflamatoria de tejido vascular y es inducida por las citoquinas y los factores de crecimiento. Por lo que la inflamación en respuesta al daño vascular está siendo reconocido como un potente contribuidor en la reestenosis [Wang et al., 2005]. El grupo ARAT mostró una expresión génica y proteica de la COX-2 en la arteria femoral muy elevada respecto al grupo AT y AR.

Se ha documentado que la inflamación juega un papel fundamental en el desarrollo y rotura de la placa aterosclerótica, de forma directa o interactuando con los factores de riesgo tradicionales (hipertensión, tabaquismo, resistencia a insulina, dislipemia). Este proceso de rotura se ha demostrado que ocurre con mayor frecuencia en la zona de los hombros de la placa, un área caracterizada por un elevado contenido inflamatorio [Jeziorska et al., 1999]. En la lesión, las células T activadas estimulan la liberación de MMPs por los macrófagos, que degradan la matriz extracelular provocando el debilitamiento de la cápsula fibrosa. Se han observado que placas ricas en lípidos con capa fibrosa contiene más cantidad de MMP que las capas densas [Johnson et al., 1998]. Estas enzimas son capaces de degradar el colágeno de la capa fibrosa que protege la placa, haciéndola susceptible de ruptura. El examen histopatológico de estas lesiones presenta una inflamación evidente que se puede extender a la túnica media, induciendo atrofia y fibrosis. Evidencias experimentales han confirmado que las MMP juegan un papel crucial en varias patologías (inflamación, artritis, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar y cáncer) por lo que se están investigando posibles inhibidores de estas enzimas para el uso terapéutico. Entre las MMP, la MMP-9 tiene un papel importante en el lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, artritis reumatoide, aterosclerosis, esclerosis múltiple, polimiositis, en las metástasis y en el desarrollo de tumores malignos [Mendis et al., 2006]. El grupo ARAT presentó una expresión proteica de la MMP-9 en la femoral aumentada respecto al grupo AT. Estos datos se apoyan en resultados obtenidos de las placas ateroscleróticas avanzadas humanas en las que se ha descrito el aumento del contenido de la MMP-9 derivada de los macrófagos en la separación íntima-media. Este aumento de la actividad de las MMPs está asociado con la ruptura de la elástica interna, y sirve de predictor de la ruptura de la placa. La mitad de los infartos ocurren en las lesiones con una estenosis menor del 50%, estenosis insignificante desde el punto de vista hemodinámico. Sin embargo, la inflamación parece tener un papel importante en el evento, la inflamación en la placa se asocia con una elevación de los niveles de la PCR y del fibrinógeno [Kaperonis et al., 2006]. Se ha descrito que la MMP-9 está implicada en la ruptura de la placa [Nomoto et al., 2003] y su

producción depende de la PGE2 en los macrófagos y en los linfocitos T [Cipollone et al., 2001]. Dicha expresión es bloqueada por la inhibición selectiva de EP4, un miembro de la familia de receptores de la PGE2 [Pavlovic et al., 2006]. Algunos autores sugieren que la detección de la MMP-9 en plasma podría usarse como marcador de la degradación de la matriz extracelular cardíaca implicada en el remodelado del ventrículo izquierdo [Sundstrom et al., 2004] y que el papel de la MMP-9 en la angiogénesis podría favorecer la invasión tumoral en la pituitaria [Turner et al., 2000]. Además se conoce que la 5-LOX es un marcador de riesgo CV precipitado por MMPs [Cipollone et al., 2005].

Los modelos animales de daño arterial se caracterizan por el desarrollo de la hiperplasia intimal causada por la migración y replicación de las células del músculo liso. La hiperplasia intimal es un importante componente de la placa aterosclerótica y un paso crítico en el desarrollo de la reestenosis y está mediada por quimioattractantes y genes mitógenos. Estas moléculas proceden de células endoteliales, células del músculo liso (activadas por leucocitos) y fibroblastos, además del torrente sanguíneo [Charo et al., 2004]. Hemos observado que el área de tinción por macrófagos de la arteria femoral están aumentados de modo significativo en los conejos ARAT respecto a los AT. La artritis aumenta los fenómenos inflamatorios (aumento de la expresión del MCP-1 y de la COX-2) y los fenómenos proteolíticos (MMP-9) a nivel de la arteria femoral. Esto implica la presencia de una placa más inestable en el grupo ARAT que en el AT. Los estudios realizados en la aorta muestran un aumento del número de conejos que presentan placa en el grupo ARAT respecto al grupo AT.

Todos estos resultados muestran que la inducción de la AR y de la AT en un modelo combinado en conejos, produce una arteriosclerosis acelerada.

2.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CELECOXIB SOBRE EL MODELO COMBINADO DE AR Y AT.

En la artrosis y la AR el tratamiento con coxibs ha demostrado una mayor efectividad frente al placebo y una efectividad semejante que los antiinflamatorios convencionales con menor toxicidad gastrointestinal sin embargo se está cuestionando su seguridad [Bannwarth et al, 2005]. En esta tesis hemos estudiado el efecto del celecoxib, una potente molécula antiinflamatoria noesteroidea (AINE) que inhibe COX-2 de forma selectiva y se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide, la artrosis, dismenorrea y dolor agudo post-quirúrgico [Ding et al., 2005].

2.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos

Los resultados obtenidos en el estudio de los conejos tratados respecto al grupo ARAT muestran que el tratamiento con el CX es capaz de revertir en parte este síndrome de inflamación-caquexia. El grupo que recibió el CX muestra una mejoría en el nivel de TG, pero no de col-HDL, una mayor ganancia de peso y una disminución de los niveles séricos tanto de IL-6 como de PCR respecto al grupo con el modelo combinado. Se ha demostrado en el tratamiento con CX la mejoría de la función endotelial, relacionada con una vasodilatación dependiente de endotelio, y una disminución de los niveles de PCR y de LDL-col [Spektor et al, 2005]. El estudio *in vitro* del tratamiento con CX en monocitos de pacientes con síndrome coronario agudo, demostró la disminución significativa de la secreción de la IL-6 y de la MMP-9 de manera dosis dependiente [Wong et al., 2001].

2.2. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2

El grupo ARAT mostró una expresión de MCP-1 en PBMC muy elevada que el fármaco no fue capaz de modificar, lo que puede atribuirse a la hipercolesterolemia como potente inductor del reclutamiento de macrófagos y a la disminución de PGE₂ (inhibidor de la expresión de MCP-1 *in vitro* e *in vivo*) acción propia de los coxib. También es posible que la elevada expresión de ARN de MCP-1 no se traduzca a un aumento en la proteína de MCP-1 [Bea et al., 2003]. La expresión de la COX-2 en PBMC no disminuyó en los animales tratados respecto a los animales ARAT.

2.3. Estudio de las lesiones sinoviales

El tratamiento con el coxib redujo significativamente el grado de sinovitis y disminuyó la expresión proteica de la COX-2 de forma significativa. Este efecto se había demostrado previamente en experimentos con ratas con artritis inducida por adyuvante de Freund, acompañado de una reducción de la hinchazón articular, de la respuesta hiperalgésica y de la destrucción del cartilago [Noguchi et al, 2005]. Parece que en nuestro modelo, las prostaglandinas mediadas por la COX-2 juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad y el CX parece un fármaco útil en el tratamiento de la AR.

2.4. Estudio de las lesiones arteriales

El tratamiento con CX no redujo la relación del grosor íntima media de las arterias femorales respecto al grupo ARAT ni el porcentaje de macrófagos en el área lesionada. Sin embargo, estudios recientes han evaluado el

efecto del celecoxib en la expresión del MCP-1 en el vaso y en la formación de la neoíntima en un modelo de daño arterial en conejos. Se obtuvieron datos que demostraban un aumento de la COX-2 posterior al daño vascular y que el CX reducía la hiperplasia intimal asociada a una reducción de la expresión del MCP-1, la infiltración celular inflamatoria y la actividad de la MMP-2 (enzima proinflamatoria en respuesta al daño vascular) [Kim et al., 2005].

Respecto a la expresión proteica de la COX-2 en la femoral, el tratamiento logró disminuir el valor respecto al grupo ARAT. Otros autores demostraron que los monocitos y macrófagos humanos activados expresan la COX-2 que produce PGF2 α y eicosanoides, que tienen un efecto proinflamatorio e inducen la proliferación celular [Wang et al., 2005]. Además la adhesión de los monocitos está estimulada por las LDLox y por la IL-1 que son dependientes de la COX-2. También se sabe que la COX-2 media señales de factores de crecimiento mitógenos y media en la apoptosis, favoreciendo la proliferación de células del músculo liso, y que la inhibición de esta enzima induce la apoptosis. Varios estudios han demostrado que células del músculo liso estimuladas con mitógenos *in vitro* presentan niveles elevados de la COX-2. Además ratas que sufren un daño vascular muestran un incremento de la expresión de la COX-2 durante las dos semanas siguientes al daño, mientras que la expresión de la COX-1 no se altera, lo que demuestra que la COX-2 sólo se detecta en los segmentos arteriales dañados. Se conoce que la COX-2 se expresa en las lesiones ateroscleróticas humanas, siendo su elevación un síntoma de desestabilización en placas asintomáticas. Todos esos estudios sugieren la inhibición selectiva de la COX-2 podría tener efectos beneficiosos reduciendo la inflamación vascular con la consecuente estabilización de la placa. Estudios semejantes a los nuestros en modelos experimentales animales con conejos, con dieta hipercolesterolémica y disección femoral con nitrógeno gaseoso y tratados con el CX muestran una reducción de la expresión del MCP-1, inhibición significativa de la hiperplasia intimal y reducción de la infiltración de macrófagos. Según este estudio, el tratamiento con el CX disminuye la respuesta inflamatoria y la hiperplasia intimal que se produce tras un daño vascular, posiblemente por la inhibición de la expresión del MCP-1, lo que implica un papel inductor de la inflamación en la patogenia de la reestenosis [Wang et al., 2005].

El estudio de la expresión proteica de la MMP-9 en las arterias femorales reveló una disminución significativa en el caso de los conejos tratados con el CX respecto al grupo ARAT. Nuestros datos coinciden con otros estudios anteriores. El estudio *in vitro* del tratamiento con el CX en monocitos de pacientes con síndrome coronario agudo, demostró la disminución significativa de la secreción de la IL-6 y de la MMP-9 en un 48-50% respecto a los niveles de los individuos controles de manera dosis dependiente [Wong et al., 2001]. En estudios realizados en células cancerígenas de pulmón han propuesto que el efecto quimiopreventivo del CX puede deberse a la supresión del NF- κ B o de los productos génicos regulados por NF- κ B (ciclina D1, COX-2 y MMP-9), ya que este factor regula la inflamación, proliferación y angiogénesis [Shishodia et al., 2004]. Otros estudios han demostrado que las MMPs juegan un papel muy importante en el proceso de remodelado, tanto positivos como negativos. Se ha demostrado también que la COX-2 se coexpresa con las MMPs en los macrófagos, células del músculo liso y

células endoteliales en las lesiones ateroscleróticas. Esta codistribución muestra que el nivel de expresión de MMP en el tejido está disminuido por la administración del CX. [Wang et al., 2005].

Algunos estudios han demostrado que los inhibidores selectivos de la COX-2 afectan al riesgo cardiovascular mediante diversos mecanismos: algunos pueden incrementar el daño (por la inhibición de la producción de prostaciclina que aumenta la actividad protrombótica) y otros pueden reducirlo (por la inhibición de la inflamación). Sin embargo se sabe que no todos los inhibidores del COX-2 aumentan el riesgo de daño cardiovascular. El estudio VIGOR demostró, mediante datos observacionales y por meta-análisis, un incremento significativo del riesgo cardiovascular, como resultado de una menor vasodilatación y antiagregación, en pacientes tratados con rofecoxib (sulfonamida inhibidora de la COX-2) por lo que se retiró del mercado [Spektor et al, 2005]. En el caso de los tratamientos con el CX, se están realizando estudios clínicos ya que los resultados hasta el momento no son concluyentes. Los resultados del tratamiento con celecoxib expuestos en esta tesis, mostraron una reducción de la expresión de la COX-2 y de la MMP-9 y una disminución del valor del cociente del grosor íntima-media y del área de tinción de macrófagos en la femoral. Esto unido a la disminución de la PCR sérica sugiere un menor riesgo CV durante el tratamiento con el CX, consiguiendo en el modelo combinado una placa más estable. En esta tesis, los estudios realizados en la aorta mostraron un mayor número de conejos que presentaban placa en el grupo ARAT respecto al grupo AT. El tratamiento con el CX no modificó el número de aortas dañadas respecto al grupo ARAT, los conejos tratados no presentaron un mayor riesgo cardiovascular. Estos resultados parecen indicar que el mecanismo de acción del CX es distinto al rofecoxib, que muestra un potente mecanismo no enzimático. Entre las diferencias entre ambas inhibidores de la COX-2, está que el CX no modifica los niveles en plasma de los radicales de oxígeno y que no tiene efectos significativos en la oxidación de las LDL, propiedades que se han observado en el caso del rofecoxib. Estos mecanismos, todavía poco conocidos, podrían explicar la diferencias en el incremento del riesgo CV entre los dos coxibs [Walter et al., 2004; Mamdani et al., 2004]. Por otra parte, el rofecoxib no disminuyó la expresión de la MMP-9 en aneurismas aórticos experimentales [Armstrong et al., 2005] ni modificó su expresión en pacientes con historia de daño agudo coronario [Bogaty et al., 2004] Nuestros datos se apoyan en otros estudios, como los realizados con ratones deficientes del receptor de LDL tratados con el CX durante 6 semanas que mostraron una reducción del contenido de macrófagos y del tamaño de la lesión aterosclerótica [Bea et al., 2003]. Otros ensayos relacionan la reducción de la infiltración de macrófagos con la disminución de la expresión de la COX-2 [Hernández-Presa et al., 2002]. Se ha demostrado que el tratamiento con el CX mejora la función endotelial, relacionada con una vasodilatación dependiente de endotelio, y una disminución de los niveles de PCR y de LDL-col. Se necesitan más estudios relativos al posible daño CV de los diferentes coxibs, solos y en combinación con aspirina [Spektor et al, 2005]. Desde que se relacionó el uso de coxib con el incremento de eventos trombóticos cardiovasculares se está intentando sacar nuevos coxib con mayor selectividad bioquímica que eviten esos efectos secundarios [Bannwarth et al, 2005].

3.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SULFATO DE GLUCOSAMINA Y CON CONDROITÍN SULFATO SOBRE EL MODELO COMBINADO DE AR Y AT.

El condroitín sulfato (A y C), el hidrocloreuro de glucosamina y el sulfato de glucosamina son productos naturales que se están utilizando para el tratamiento de la artritis. Todos ellos pertenecen a una clase de compuestos conocidos como glicosaminoglicanos (GAG). Existen trabajos que explican las propiedades antiinflamatorias de estos aminoglicósidos por su capacidad de regular la expresión y síntesis de NO y de PGE₂. La efectividad subóptima de los coxibs y sus posibles riesgos CV han obligado a buscar nuevas drogas para el tratamiento de la AR y de la OA; los GAG parecen opciones efectivas y seguras para el tratamiento de OA [Chan et al., 2005].

La glucosamina es un amino monosacárido sintetizado por todas las células cuando la glucosa entra en la ruta de las hexosaminas y que participa reconstruyendo los GAG presentes en la matriz amorfa extracelular en hueso y cartílago. La glucosamina exógena deriva de la quitina, un biopolímero presente en el exoesqueleto de los animales invertebrados marinos, y es tomada por los receptores celulares GLUT-2 y GLUT-4. Los derivados de la glucosamina, el sulfato de glucosamina, la glucosamina-HCL y la N-acetil-glucosamina, han demostrado ser muy beneficiosos en el tratamiento de la OA tanto en modelos con animales como con humanos por su capacidad condroprotectora. Estos azúcares son capaces de restaurar la matriz extracelular rica en proteoglicanos, es decir, mantener el balance del catabolismo y anabolismo del cartílago articular [James et al., 2001; Ma et al., 2002; Chou et al., 2005]. En la actualidad, se ha aceptado al SG como un potente agente terapéutico de la OA por su capacidad de inhibir los efectos catabólicos de las moléculas proinflamatorias presentes en el cartílago, como la IL-1 [Largo et al., 2003]. Además, inhibe la activación y la translocación al núcleo del NF-κB inducido por IL-1 en condrocitos artrósicos y en células sinoviales humanas [Gouze et al., 2002]. Esta inhibición resulta en una disminución de la síntesis de la COX-2, de la liberación de PGE₂, y, en condrocitos, una disminución de la liberación de NO. El SG disminuye la síntesis de MMP inducida por IL-1 en ambos tipos celulares [Álvarez-Soria et al., 2005]. El tratamiento en humanos se recomienda vía oral, a pesar de no tener transporte intestinal activo, a una dosis diaria de 1500mg [Simánek et al., 2005]. Una revisión de 20 ensayos controlados publicada recientemente indica que el SG tiene un efecto moderadamente superior sobre el dolor y la mejoría de la función respecto al placebo. Dos ensayos de tres años de duración muestran que el SG reduce la progresión de los cambios estructurales de la articulación de pacientes con OA. Otros datos concluyen que el SG presenta una acción más eficaz a las 12 semanas de administración cuando se le compara con otro AINE (piroxicam). Estas observaciones sugieren que la glucosamina puede ser un agente antiinflamatorio seguro para el tratamiento de enfermedades articulares [Hua et al., 2005]. Estos datos nos permitieron elegir el SG con el fin de observar sus efectos sobre la evolución de nuestro modelo experimental de arteriosclerosis acelerada por la artritis crónica.

El CS consiste en una secuencia de D-glucuronato y N-acetil-D-galactosamina-4/6-sulfato. Es un componente esencial del tejido conectivo de la matriz extracelular, incluyendo el cartílago hialino, que proporciona elasticidad. Pertenece a la heterogénea familia de los GAG con un alto peso molecular y elevada densidad de carga. Su fórmula se obtiene a partir del cartílago porcino o bovino, además del cartílago de tiburón, y la dosis recomendada es de 800mg/día [Simánek et al., 2005]. El versicano, el proteoglicano más abundante en la matriz extracelular de las arterias, es un tipo de CS de alto peso molecular sintetizado por las células del músculo liso de la íntima. Numerosos estudios han indicado que el versicano está implicado en los procesos de lesión aterosclerótica y de reestenosis. Además análisis realizados en las arterias aortas ateroscleróticas y en articulaciones artrósicas humanas han demostrado cambios en los patrones de sulfatación de los proteoglicanos. El engrosamiento intimal parece debido a la retención de las LDLox en la íntima causada por los proteoglicanos ricos en CS. Otros estudios sugieren que los proteoglicanos interviene en las complicaciones trombóticas de la AT. Ensayos *in vitro* han demostrado que el CS revierte el efecto de IL-1 β en la síntesis de proteoglicanos y prostaglandinas en los condrocitos e inhibe la función citolítica del complemento. Otros estudios demostraron que el CS revierte la pérdida de GAG *in vitro* e *in vivo* [Chou et al., 2005]

3.1. Estudio de los parámetros sistémicos: inflamatorios y metabólicos

El tratamiento con SG y con CS pero disminuyó el nivel de triglicéridos y, en el caso del CS, disminuyó la concentración de colesterol total sérico respecto al modelo ARAT. El tratamiento con SG no aumentó la glucosa en sangre a pesar de las altas dosis utilizadas, nuestros datos se apoyan en estudios realizados recientemente en modelos animales tratados con glucosamina intravenosa que no han mostrado resistencia a insulina [Stumpf et al., 2006] y en otros realizados en pacientes con artritis que demuestran que la dosis empleada actualmente no induce resistencia a insulina [Duan et al., 2005].

En cuanto a la inflamación sistémica medida por la IL-6 y la PCR séricas, ambos tratamientos mostraron una disminución significativa de los dos parámetros. Estudios realizados en células en monocapa de la retina estimuladas por varias citoquinas demostraron que el SG modula la adhesión leucocitaria mediada por ICAM-1 (inducida por IL-1, IL-6, TNF α y TNF γ), inhibe la translocación de la subunidad p65 del NF-kB (previene la degradación de NF-kB) y disminuye el número de neutrófilos adheridos a la monocapa [Chen et al., 2006]. También se ha sugerido que puede interferir en la acción de las citoquinas proinflamatorias de los condrocitos humanos como la IL-6 y, por tanto, en su producto hepático, la PCR [Zhang et al., 2005]. Muchos estudios han demostrado que los efectos beneficiosos sobre el metabolismo del tejido conectivo son inducidos por su capacidad antiinflamatorias: suprime las funciones neutrófilas, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias secretadas por condrocitos, inhiben la liberación de elastasas y la quimiotaxis por neutrófilos [Ma et al., 2002]. Por otro lado, el tratamiento combinado de CS y SG reduce nivel de IL-1 β en el suero en un modelo de OA en conejos [Chou et al., 2005].

3.2. Estudio del estado de activación pro-inflamatorio de las células mononucleares de la sangre periférica: MCP-1 y COX-2

La medida del valor de COX-2 y de MCP-1 en PBMC también disminuyó de forma significativa con los dos tratamientos. Se ha demostrado que la glucosamina posee actividad antiinflamatoria, es capaz de inhibir la producción de NO y de PGE₂ in vitro en cultivos sinoviocitos y condrocitos de pacientes artríticos. Estudios realizados por nuestro laboratorio en condrocitos artríticos humanos tratados con SG, demostraron que es capaz de inhibir la activación de NF-κB inducida por IL-1β. El SG previene la degradación de IκBα en el citoplasma celular y la migración al núcleo de las subunidades p50 y p65, la subunidad p50 está asociada a la destrucción del cartílago durante la inflamación. Observamos también que la síntesis y expresión de COX-2 se reducía por la acción del SG, de forma selectiva frente a COX-1, lo que implica que la inhibición del factor NF-κB controla la liberación de PGE₂, de NO y las funciones de los neutrófilos [Largo et al., 2003]. Experimentos realizados en condrocitos de la articulación de caballo estimulados por IL-1β e incubados con SG, a la concentración encontrada en plasma tras la administración oral, mostraron una expresión del ARNm de MMP-13, COX-2 y iNOS reducida respecto a los controles [Neil et al., 2005]. Otros autores han demostrado que el tratamiento con SG también posee efecto inmunosupresor. Experimentos realizados en ratones muestran que el tratamiento con este monómero prolonga la supervivencia del injerto cardíaco de ratones suprimiendo la activación de linfoblastos T y de las células dendríticas y que suprime el crecimiento de un parásito (*Plasmodium falciparum*) interfiriendo con la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol [Hua et al., 2004]. Además la glucosamina inhibe significativamente los niveles plasmáticos de NO y de PGE₂ en las ratas artríticas [Hua et al., 2005]. Los datos muestran que el SG y la glucosamina-HCl, no la N-acetil-glucosamina, inhiben la proliferación de las células T, de los linfocitos T citotóxicos y la secreción de TNF-γ. Como ya observamos nosotros, algunos de estos efectos deben estar relacionados con la inhibición de la activación del NF-κB como lo demuestra que el tratamiento con glucosamina inhiba la expresión de TNF-α codificado por NF-κB [Zhang et al., 2005]. Otras investigaciones demostraron que la glucosamina es un agente eficaz suprimiendo la activación de las células T y de las células dendríticas humanas, dos líneas celulares cruciales en la respuesta inmune, de modo reversible, específico y sin riesgo para la supervivencia celular. Este efecto es más potente en la glucosamina respecto a otros aminoazúcares (la galactosamina no afecta y la manosamina afecta algo pero no es comparable). De todos estos resultados se concluye que el tratamiento con glucosamina suprime la actividad inmune, de modo que el tejido sinovial se puede regenerar. La ausencia de mediadores inflamatorios y del dolor generados por las células inmunitarias en la zona del cartílago erosionadas permite una mejoría más lenta [Ma et al., 2002].

Además, la combinación de CS y SG (en un rango medido en líquido sinovial y en sangre después de la administración oral) en explantes de cartílago bovino estimulado por IL-1β anula la inducción de los genes de iNOS, COX-2, mPGEs1 y NF-κB y reduce la expresión de NO y PGE₂. Suprimen la síntesis y expresión de los

genes inflamatorios y enzimas proteolíticas mientras sobrerregulan TIMP-3. podría tratarse del mecanismo de acción antiinflamatorio y condroprotector [Chan et al., 2005; Chan et al., 2006].

3.3. Estudio de las lesiones sinoviales

En el estudio de la membrana sinovial, como ya se ha indicado, el grupo ARAT presentó hiperplasia intimal de alta densidad celular, hipervascularización y fibrosis difusa y focos leucocitarios múltiples y organizados. Tanto el tratamiento con CS como con SG lograron reducir el grado de sinovitis, además el primero redujo la hiperplasia sinovial significativa. Se ha demostrado que la glucosamina suprime la progresión de la artritis por adjuvante de Freund en ratas inhibiendo la fase crónica de la inflamación, es decir, suprime la artritis, reduce la incidencia de la enfermedad, disminuye la hinchazón y frena el cambio de peso. Además de reducir el hinchazón de las articulaciones, logra mejorar los parámetros histopatológicos de las articulaciones que sufren la AR: hiperplasia sinovial, formación del pannus, erosión del cartílago e infiltración leucocitaria, restableciendo la función articular [Hua et al., 2005]. Además nuestro grupo observó que el SG puede modificar la actuación de la collagenasa y restaurar el balance entre la degradación y la síntesis de GAG [Largo et al., 2003]. Experimentos realizados en condrocitos de la articulación de caballo estimulados por IL-1 β e incubados con SG, a la concentración encontrada en plasma tras la administración oral, mostraron una expresión del ARNm de MMP-13, COX-2 y iNOS reducida respecto a los controles [Neil et al., 2005].

Como se ha indicado en la introducción, el CS pertenece al grupo denominado SYSADOA y posee una larga lista de actividades biológicas. Desde el punto de vista farmacológico tiene un efecto lento pero gradual reduciendo los síntomas de la OA y los beneficios se mantienen un periodo largo después de terminar con el tratamiento. Muchos autores han propuesto un efecto antiinflamatorio y condroprotector del CS modificando la estructura del cartílago [Volpi et al., 2002; Volpi et al., 2005]. Un estudio con 42 pacientes con OA se trataron con CS vía oral demostró que el CS es una droga segura y de acción lenta en el tratamiento de los síntomas de la OA (mejoró el dolor y la capacidad de movimiento). Estabiliza el espacio articular y modula el metabolismo de la articulación y del hueso [Uebelhart et al., 1998; Bucsi et al., 1998]. En otro trabajo, conejos con daño en el cartílago articular por inyección de quimiopapaina se trataron con CS vía oral e intramuscular. Los tratamientos mejoraron el contenido de proteoglicanos (PG) y se concluyó que el CS tiene un efecto protector del cartílago por la neosíntesis de los PG de la matriz [Uebelhart et al., 1998].

En otros experimentos se expusieron cultivos de cartílago bovino a fragmentos de fibronectina, que aumenta las citoquinas catabólicas y las MMP, y se trataron con CS y SG. La actuación sinérgica de estas drogas logró revertir el daño y promover la reparación a concentraciones encontradas en plasma tras la ingestión oral [Homandberg et al., 2006]

Otros investigadores probaron la acción de glucosamina-HCl+CS+vitamina derivada de B1 en un modelo de conejos con OA experimental. En este modelo la actividad condroprotectora de los GAG combinados

se vio amplificada por la vitamina, efecto asociado con la reducción de MMP-1 en la zona lesionada [Kobayashi et al., 2005]

Estudios realizados en ratas artríticas demostraron que el tratamiento con CS, glucosamina-HCl y con ascorbato de manganeso disminuía la severidad de la enfermedad. Además el tratamiento combinado con SG y CS aminora los signos de la artritis en perros, conejos y caballos. Estudios previos demostraron que CS y SG combinados reducían la degradación del cartílago en un modelo de OA en conejos. En la AR humana se aumentan los niveles de IL-1 β y de MMP-9, proteasa que elevada tanto en la forma latente como en la activa de la AR. El tratamiento combinado de CS y SG aminora las marcas clínicas, incidencia de la enfermedad, temperatura e hinchazón de la articulación, daño en el cartílago síntesis de IL-1 β y de MMP-9 todo ello asociado a la AR experimental. El nivel de IL-1 β se reduce tanto en la articulación como en el suero. El tratamiento con CS y el combinado atenúa el daño en el cartílago. Otros estudios demostraron que el CS y/o SG revierten la pérdida de GAG *in vitro* e *in vivo*. La acción del CS y del SG en el cartílago sometido a IL-1 β reduce la producción de PGE₂, de modo que inhiben el daño de manera directa. También revierten el aumento de la actividad y expresión de MMP. El efecto condroprotector del CS más el SG en este modelo se asocia a la reducción de IL-1 β y de MMP-9 [Chou et al., 2005]

3.4. Estudio de las lesiones arteriales

Nuestros datos mostraron una expresión génica de MCP-1, en la arteria femoral, aumentada de forma significativa en todos los grupos respecto al grupo control sano. Ambos tratamientos permitieron disminuir este parámetro de forma significativa respecto al grupo ARAT. La expresión génica y proteica de COX-2 en la arteria femoral está muy elevada en el grupo ARAT, los tratamientos redujeron esta expresión de forma significativa.

Como ya se ha dicho, la AR es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación poliarticular crónica, que conlleva unos cambios en la articulación: hinchazón, formación del pannus, dolor y pérdida de la función. Una variedad de mediadores inflamatorios han sido descritos para la OA y la AR: la IL-1 β , la síntesis de prostaglandinas, la resorción ósea y la síntesis de MMP. La IL-1 β aumenta los niveles de MMP-9 en la membrana sinovial, que favorece a la degradación del hueso y del cartílago, aumentando el dolor. Dado que el desequilibrio entre síntesis-degradación del cartílago es una característica común de las dos patologías, el SG exógeno puede ser una fuente de hexosaminas y de sulfatos precursores de GAG. Estudios previos han demostrado que la glucosamina-HCl previene la pérdida de GAG en modelos de daño articular por inyección de quimiopapaina [Chou et al., 2005]. En esta tesis se ha medido el nivel de MMP-9 en la femoral, la expresión proteica de la MMP-9 tras el tratamiento con SG se redujo significativamente respecto al grupo ARAT. Estudios anteriores presentan también una reducción de la destrucción enzimática de la matriz extracelular *in vitro* tras la adición del SG [Chou et al., 2005]. Datos previos muestran que el efecto de la glucosamina, tanto el SG como la glucosamina-HCl, probada en explantes humanos con OA reduce la actividad de los genes que codifican para los procesos anabólicos (agrecanos) y catabólicos (MMP), ésta última actividad podría explicar su efecto

condroprotector. Estudios realizados con SG en cultivos de células humanas demostraron que el tratamiento disminuye la producción de MMP-9 en los cultivos sinoviales y meniscales [Uitterlinden et al., 2006]. Evidencias experimentales demuestran que la MMP-9 tiene un papel en la estabilidad de las metastasis y está aumentada en la mayor parte de los tumores malignos, por lo que se están buscando nuevos inhibidores de esta proteasa, entre ellos un derivado de la glucosamina [Mendis et al., 2006].

Como se ha explicado, el remodelado de los tejidos se establece principalmente por el equilibrio entre las MMP y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP). En situaciones de estrés oxidativo este equilibrio no existe. Estudios recientes demostraron que el CS comercial es capaz de limitar la peroxidación lipídica durante el estrés oxidativo. Un ensayo realizado en fibroblastos humanos en cultivo sometidos a ascorbato y tratados con CS purificado del plasma humano, mostró que es capaz de restablecer la homeostasis MMP/TIMP, aumentar la supervivencia celular, reducir el daño en el ADN e inhibir la peroxidación lipídica [Campo et al., 2006].

El tratamiento con CS y SG redujo la expresión de COX-2 y de MMP-9 y disminuyó el valor del cociente del grosor íntima-media, pero no redujo el área de tinción de macrófagos en la femoral. Los estudios realizados en la aorta muestran sólo un caso de lesión en el tratamiento con CS. En cuanto a la posible acción de la glucosamina en el proceso aterosclerótico, los estudios se han centrado en su acción sobre los proteoglicanos, un heterogéneo grupo de moléculas que se encuentran en la pared arterial, y en las plaquetas. Se ha descrito en individuos con AT la alteración de los proteoglicanos, en cuanto a su concentración y composición en áreas prelesionadas y lesionadas. Existe una teoría llamada de la respuesta a la retención, que explica que en estados de AT los proteoglicanos unen y retienen las LDL en el compartimento subendotelial, lo que les hace más susceptibles a la oxidación. En presencia de SG los proteoglicanos sintetizados tienen cadenas de GAG más cortas que poseen una menor afinidad y menor capacidad para unir LDL comparados con los proteoglicanos sintetizados en presencia de glucosa fisiológica. También los GAG libres sintetizados bajo la presencia de SG son más cortos y con menor afinidad por LDL. Esta alteración no tiene efectos citotóxicos [Tannock et al., 2002].

Se ha descrito a la glucosamina como un nuevo agente antiplaquetario. Las plaquetas tienen un papel muy importante en la homeostasis, contribuyen a enfermedades como el infarto de miocardio y a las enfermedades de la vasculatura periférica. En estudios preliminares, la glucosamina-HCl administrada vía oral suprimió la agregación plaquetaria por lo que parece tener una actividad antitrombótica que suprime las actividades plaquetarias [Hua et al., 2004]. El SG podría ser un nuevo agente antiplaquetario para la prevención y tratamiento de enfermedades tromboticas unido a su acción inhibitoria respecto a las plaquetas. Se ha comprobado que el SG inhibe la activación plaquetaria *in vitro* y que el tratamiento oral en cerdos tiene efecto inhibitorio *in vivo* suprimiendo la agregación plaquetaria, la liberación de ATP y la producción de TXA₂ [Lu-Suguro et al., 2005]. También es capaz de suprimir de forma moderada la agregación plaquetaria, la liberación de los contenidos de los orgánulos (ATP), la producción de TXA₂, la movilización de Ca²⁺ e inhibir los receptores de ADP de las plaquetas de sangre periférica humana. Estos experimentos realizados a la par con N-acetil-glucosamina dieron resultados no significativos respecto a los resultados controles [Hua et al., 2004].

Otra teoría formulada se basa en los procesos que influyen en la AT, entre los que se encuentran: disminución de los proteoglicanos de sulfato de heparina vascular (PGSH), el aumento de la permeabilidad vascular y el aumento de las células del músculo liso. Cuando la glucosamina es exógena, puede utilizarse como precursora de PGSH en células endoteliales y células del músculo liso. La pérdida de sulfatos de heparina se ha asociado con procesos como la aterosclerosis y por la acción de agentes inflamatorios como lipopolisacáridos, TNF- α , homocisteína y LDLox. En la AT la glucosamina aumenta los PG ateroprotectores y disminuye o no afecta a los PG aterogénicos. Un PGSH llamado perlecano es el mayor PGSH secretado por las células del músculo liso y es considerado ateroprotector. La glucosamina aumenta la producción de perlecano tanto en células endoteliales como en células del músculo liso. La glucosamina inhibe la proliferación de células del músculo liso (no de células endoteliales ni macrófagos) mediante el incremento de la expresión de perlecano en la media. Además la glucosamina induce la expresión de perlecano ya que glicosila los factores de transcripción que involucrados en su expresión. El aumento de PG ateroprotectores por la acción de la glucosamina exógena reduce los eventos aterogénicos incluyendo el transporte de lipoproteínas, la retención de monocitos y la proliferación de células del músculo liso. Se puede concluir que podría tratarse de un potencial agente antiaterogénico. [Duan et al., 2005]

VI. CONCLUSIONES

1.- Los conejos con artritis crónica inducida por antígeno, y la correspondiente inflamación sistémica, mostraron un empeoramiento tanto del perfil inflamatorio sistémico, como de las lesiones vasculares asociadas a la aterosclerosis experimental causada por la dieta hiperlipidémica y el daño vascular. Esta afirmación está sustentada en los siguientes hallazgos:

- a. Mientras que el grupo de animales con aterosclerosis (AT) presentó unas concentraciones séricas elevadas de triglicéridos, bajas de HDL-colesterol y un incremento del peso corporal respecto a los animales sanos, los animales con artritis crónica (AR) y AT (ARAT) tenían un nivel sérico bajo de triglicéridos, colesterol total y HDL-colesterol junto con una disminución del peso frente a los conejos AT.
- b. Los animales AT mostraron una concentración sérica de IL-6 y PCR significativamente superior que la de los conejos sanos, junto con un incremento significativo de la expresión génica del MCP-1 y de la COX-2 en células mononucleares de sangre periférica. A su vez, tanto los reactantes séricos de fase aguda como los datos de actividad pro-inflamatoria en estas células en el grupo ARAT estaban elevados con respecto al grupo AT.
- c. En la membrana sinovial, los animales AR y ARAT presentaron una intensa hiperplasia intimal, infiltrado leucocitario en sábana, aumento de la reacción estromal, presencia de lípidos intersticiales y de células espumosas. La expresión de COX-2 en la membrana sinovial de los grupos con AT y con AR fue superior a la de los controles, y significativamente superior en los animales ARAT respecto al grupo AT. Ni los conejos sanos ni los del grupo AT presentaron lesiones en la membrana sinovial.
- d. Respecto a la evolución de la lesión inducida por nitrógeno líquido en la arteria femoral, los animales ARAT mostraron un incremento del infiltrado de macrófagos con respecto a los conejos AT; también de la expresión génica del MCP-1 y de la COX-2, así como de la expresión proteica de la COX-2 y de la MMP-9. Esta última, exponente de una placa más inestable.
- e. El 56% de los animales del grupo ARAT presentaron placas de ateroma en la Aorta frente a un 25% en el grupo AT y ninguno entre los animales sanos.

Estos resultados demuestran que los animales a los que se indujo ambas enfermedades, artritis crónica y arteriosclerosis, desarrollaron lesiones arterioscleróticas más graves que cada grupo por separado. El modelo propuesto refleja con bastante similitud la situación de arteriosclerosis acelerada observada en varias enfermedades reumatológicas inflamatorias crónicas en humanos, como la artritis reumatoide.

Por otro lado, mientras que el perfil metabólico del grupo AT asemejó al del síndrome metabólico, el del grupo ARAT fue similar al de inflamación-caquexia.

2. - El tratamiento con Celecoxib (CX) mejoró significativamente los parámetros metabólicos estudiados, con un descenso paradójico de los niveles séricos de HDL-colesterol, y los inflamatorios (IL-6 y PCR). Tomados en su conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de la expresión y actividad de la COX-2 por el fármaco, fue capaz de revertir el síndrome de inflamación-caquexia. Si bien el tratamiento con CX no fue capaz de modificar el infiltrado macrofágico de la placa aterosclerótica, originó en la misma una disminución de la expresión de mediadores pro-inflamatorios y de la MMP-9.

3.- El tratamiento de los conejos ARAT con Sulfato de Glucosamina (GS) mejoró el perfil lipídico mostrando una disminución de los triglicéridos en suero, mientras que el Condroitín Sulfato (CS) redujo los de colesterol total. Ambos compuestos rebajaron significativamente el perfil inflamatorio del modelo, tanto de los reactantes de fase aguda como de la activación pro-inflamatoria de las células sanguíneas. Ambos fármacos atenuaron significativamente la actividad inflamatoria en la placa arteriosclerótica disminuyendo la expresión génica y / o proteica de COX-2, MCP-1 y MMP-9. Además, ningún conejo tratado con GS desarrolló lesiones espontáneas en la pared aórtica.

Por tanto, ambos compuestos parecen actuar beneficiosamente en el modelo, estabilizando las placas femorales e impidiendo la formación de placas aórticas espontáneas

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998;97:2433-44.
- Alper AB Jr, Tomlin H, Sadhwani U, Whelton A, Puschett J. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor analgesic celecoxib on renal carbonic anhydrase enzyme activity: a randomized, controlled trial. *Am J Ther.* 2006 May-Jun;13(3):229-35.
- Álvarez-Soria MA, Largo R, Calvo E, Egido J, Herrero-Beaumont G: Differential anticatabolic profile of glucosamine sulfate versus other anti-osteoarthritic drugs on human osteoarthritic chondrocytes and synovial fibroblast in culture. *Osteoarthritis Cartilage* (2005) 13:(Suppl A):P309.
- Armstrong PJ, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Suppression of experimental aortic aneurysms: comparison of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors. *Ann Vasc Surg* 2005;19:248-57.
- Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V. Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:395-402.
- Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub MH, Polak JM. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:646-55
- Bannawarth B, Berenbaum F. Clinical pharmacology of lumiracoxib, a second-generation cyclooxygenase 2 selective inhibitor. *Expert Opin Drugs* 2005;14:521-33.
- Barbieri SS, Eligini S, Brambilla M, Tremoli E, Colli S. Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2003;60:187-97.
- Barnes BJ, Karin M. Nuclear factor- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med* 1997; 336:1066-71.
- Bayston T, Ramessur S, Reise J, Jones KG, Powell JT. Prostaglandin E2 receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 2003;38:354-9.

- Bea F, Blessing E, Bennet BJ, Kuo CC, Campbell LA, Kreuzer J, Rosenfeld ME. Chronic inhibition of COX-2 does not alter plaque composition in a mouse model of advanced unstable atherosclerosis. *Cardiovasc Research* 2003;60:198-204.
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:840-5.
- Beneze J, Kiss RG, Toht-Zsamboni E, Vargova K, Kerecsen G, Korda A, Molnar F, Preda I. Inverse correlation between coronary blood flow velocity and sICAM-1 level observed in ischemic heart disease patients. *Atherosclerosis* 2006;188(1):142-9.
- Benito MJ, Sanchez-Pernaute O, Lopez-Armada MJ, Hernandez P, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G. Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:311-9.
- Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001;89:763-71.
- Boyle JJ. Macrophages activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacology* 2005;3:63-68.
- Bogaty P, Brophy JM, Noel M, Boyer L, Simard S, Bertrand F, Dagenais GR. Impact of prolonged cyclooxygenase-2 inhibition on inflammatory markers and endothelial function in patients with ischemic heart disease and raised C-reactive protein: a randomized placebo study. *Circulation* 2004;110:934-9.
- Bombardieri S, Cattani P, Ciabattoni G, Di Munno O, Pasero C, Pinca E et al. The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and non-steroidal inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 1981;73:893-901.
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-22.
- Bucsi L, Poor G. Efficacy and tolerability of oral chondroitin sulfate as a symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis (SYSADOA) in the treatment of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6 Suppl A:31-6.

- Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:2057-64.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Sama D, Calatroni A. Purified human chondroitin-4-sulfate reduced MMP/TIMP imbalance induced by iron plus ascorbate in human fibroblast cultures. *Cell Biol Int* 2006;30:21-30.
- Celotti F, Laufer S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition problem. *Pharmacologic Research*, 2001;43:429-36.
- Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 ;13:387-94.
- Chan PS, Caron JP, Orth MW. Short-term Gene Expression Changes in Cartilage Explants Stimulated with Interleukin 1ss plus Glucosamine and Chondroitin Sulfate. *Rheumatol*. 2006;33:1329-40.
- Chang PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and PGE2 in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005;13:387-94.
- Chang S-H, Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, Lane TF, Hla T. Role of PGE2-dependent angiogenic switch in COX-2 breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004.;101:591-96.
- Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation Research* 2004;95:856-66.
- Chen J, He B, Zheng D, Zhang S, Liu J, Zhu S. All-trans retinoic acid reduces intimal thickening after balloon angioplasty in atherosclerotic rabbits. *Chin Med J (Engl)* 1999 Feb;112(2):121-3.
- Chen JT, Liang JB, Chou CL, Chien MW, Shyu RC, Chou PI, Lu DW. Glucosamine sulfate inhibits TNF-alpha and IFN-gamma-induced production of ICAM-1 in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:664-72.
- Choi E. Clinical experience with inhibition of IL-6. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:405-15.

- Choi IY, Jung HS, Kim HR, Lee EJ, Shin TY, Kim HM, Hong SH. OK205 regulates production of inflammatory cytokines in HMC-1 cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1871-74.
- Chou MM, Vergnolle N, McDougall JJ, Wallace JL, Marty S, Teskey V, Buret A. Effects of chondroitin and glucosamine sulfate in a dietary bar formulation on inflammation, IL-1 β , matrix metalloproteinase-9, and cartilage damage in arthritis. *Exp Biol Med* 2005;230:255-61.
- Chun K-s, Surh Y-J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprotection. *Biochemical Pharmacology* 2004;68:1089-100.
- Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Boccoli G, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin H synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as basis of prostaglandin E₂ –dependent plaque instability. *Circulation* 2001; 104:921-7.
- Cipollone F, Mezzetti A, Fazia ML, Cuccurullo C, Iezzi A, Uchino S, Spigonardo F, Bucci M, Cuccurullo F, Prescott SM, Stafforini DM. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biology* 2005;25:1665-70.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Pharm D, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schinitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt K, Moskowitz RW, Williams J. Glucosamine , chondroitin sulfate and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *The New England Journal of Medicine* 2006;354:795-808.
- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?. *Circ Res* 2001;89:201-10.
- Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 1997;24 Suppl 49:15-9.
- Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59: 4574-7.

- Del Rincón I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and health subjects. *Arthritis & Rheumatism* 2003;7:1833-40
- Dessein PH, Stanwix AE, Joffe BI. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis: acute phase response related decreased insulin sensitivity and high-density lipoprotein cholesterol as well as clustering of metabolic syndrome features in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 2002; 4: 452-65.
- Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2005; 7: 634-43.
- Devaraj S, O'Keefe G, Jialal I. Defining the pro-inflammatory phenotype using high sensitive C-reactive protein levels as the biomarker. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;4549-54.
- DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991;1083:121-34.
- DeWitt D, Smith WL. Yes, but do they still get headaches?. *Cell* 1995;83:345-8.
- Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM. Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation caspase 9. *Int J Cancer* 2005;113:803-10.
- Doo YC, Han SJ, Lee JH, Cho GY, Hong KS, Han KR, Lee NH, Oh DJ, Ryu KH, Rhim CY, Lee KH, Lee Y. Associations among oxidized low-density lipoprotein antibody, C-reactive protein, interleukin-6, and circulating cell adhesion molecules in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2004;93:554-8.
- Duan W, Paka L, Pillarisetti S. Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovascular Diabetology* 2005;4:6-31.
- Duff GW. Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1994;100:9-19.
- Dumais N, Barbeau B, Olivier M, Tremblay MJ. Prostaglandin E2 Up-regulates HIV-1 long terminal repeat-driven gene activity in T cells via NF-kappaB-dependent and -independent signaling pathways. *J Biol Chem* 1998;273:27306-14.

- Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2004;350:29-37.
- Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease. *Hypertension* 2003;41(2): 834-41.
- Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Blanco-Colio LM, Ortego M, Suzuki Y. Transcription factor κ B (NF- κ B) and cardiovascular disease. *Risk Factors* 1999;9:159-68.
- Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature* 2001;410:430-1.
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92(3):657-71.
- Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996;93:1354-63.
- Feldmann M, Maini RN. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999;38(Suppl 2):3-7.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1: 27-31.
- Forchhammer L, Thorn M, Met O, Gad M, Weidne MS, Claesson H. Immunobiological effects of glucosamine in vitro. *Scandinavian Journal of immunology* 2003;58:404-11.
- Forsberg L, Leeb L, Thoren S, Morgenstern R, Jakobsson P. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett* 2000;471:78-82.
- Fosslein E. Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:347-85.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-75.

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;326:310-8.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-50.
- Fuster V. Thrombus remodeling. Key factor in the progression of coronary atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:2-7.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-503.
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
- Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1403-8.
- Gebhard HH, Zysk SP, Schmitt-Sody M, Jansson V, Messmer K, Veihelmann A. The effects of celecoxib on inflammation and synovial microcirculation murine antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:63-70.
- Giles JT, Fernandes V, Lima J, Bathon JM. Myocardial dysfunction in rheumatoid arthritis: epidemiology and pathogenesis. *Arthritis Research & Therapy* 2005;7:195-207.
- Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 1992;13:34-6.
- González-Gay MA, González-Juanatey C, Pineiro A, García-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-Grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 2005;32:1219-23.
- Goodson N. Coronary artery disease and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:115-20.
- Gouze JN, Bianchi A, Becuwe P. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway. *FEBS Lett* (2002) 510:166-170.

- Grover S, Sinha RP, Singh U, Tewari S, Aggarwal A, Misra R. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis in India. *J Rheumatology* 2006;33:244-47.
- Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R, Gladue R, Rollins B. *In vivo* properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 1997;62:577-80.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1975; 72:2994-8.
- Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995; 147:266-267.
- Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* 2001;104:63-7.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91:7A-11A.
- Herbrig K, Haensel S, Oeschlagel U, Pistroch F, Foester S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2005;157-63.
- Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:1532-41.
- Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Egido J.I. ACE inhibitor quinapril reduces arterial expression of nuclear factor kappa B dependent proinflammatory factors but not collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998;153:1825-37.
- Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;160:49-58

- Hoefer IE, Grundmann S, van Royen N, Voskuil M, Schirmer SH, Ulusans S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis* 2005;181:285-93.
- Homandberg GA, Guo D, Ray LM, Ding L. Mixtures of glucosamine and chondroitin sulfate reverse fibronectin fragment mediated damage to cartilage more effectively than either agent alone. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(8):793-806.
- Howson P, Shepard N, Mitchell N. The antigen induced arthritis model. The relevance of the method of induction to its use as a model of human disease. *J Rheumatol* 1986;13:379-85.
- Hua J, Suguro S, Iwabuchi K, Tsutsumi-Ishii Y, Sakamoto K, Nagaoka I. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses the ADP-mediated platelet activation in humans. *Inflammation Research* 2004;53:680-88.
- Hua J, Suguro S, Hirano S, Sakamoto K, Nagaoka I. Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflammation Research* 2005;54:127-32.
- Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B et al. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum* 2001;44:2761-7.
- Iñiguez MA, Punzón C, Fresno m. Induction of COX-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by COX-2 inhibitors. *The journal of immunology* 1999;163:111-19.
- Iñiguez MA, Rodríguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine* 2003;9:73-78
- Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703-2711.
- Isomaki HA, Mutru O, Koota K. Death rate and causes of death in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1975;4:205-8
- Ito T, Ikeda U. Inflammation, cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:257-67.

- Jang BC, Kim DH, Park JW, Kwon TK, Kim SP, Song DK, Park JG, Bae JH, Mun KC, Bae WK, Suh MH, Hla T, Suh SI. Induction of cyclooxygenase-2 in macrophages by catalase: role of NF-kappaB and PI3K signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:398-406.
- James CB, Uhl TL. A Review of Articular Cartilage Pathology and the Use of Glucosamine Sulfate. *J Athl Train*. 2001;36:413-419.
- Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 1999;188: 189-96.
- Jian Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148:2423-8.
- Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular Res* 2003;59:812-823.
- Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1707-15.
- Johnson JL, van Eys GJ, Angelini GD, George SJ. Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1146-51.
- Jonsson SW, Backman C, Johnson O, Karp K, Lundstrom E, Sundqvist KG, Dahlqvist SR. Increase prevalence of atherosclerosis in patients with medium term rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 2001;28:2597-602.
- Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* 1994;90:1669-78
- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:368-72.
- Kaperonis EA, Lippis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surgery* 2006; 31: 386-393.

- Karasek D, Vaverkova H, Halenka M, Novotny D. Soluble cell adhesion molecules s-VCAM and s-ICAM in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Biomed Pap Med Univ Palacky Olomouc Czech Republic* 2005;149:101-8.
- Katrib A, Tak PP, Bertouch JV, Cuello C, McNeil HP, Smeets TJ, Kraan MC, Youseef PP. Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2001;40:988-94.
- Kim MY, Byeon CW, Hong KH, Han KH, Jeong S. Inhibition of angiogenesis by the MCP-1 binding peptide. *FEBS Lett* 2005;579:1597-601.
- Kimmel SE, Berlin JA, Reilly M, Jaskowiak J, Kishel L, Chittams J, Strom BL. Patients exposed to rofecoxib and celecoxib have different odds of nonfatal myocardial infarction. *Ann Intern Med* 2005; 142:157-64.
- Kobayashi T, Notoya K, Nakamura A, Akimoto K. Fursultiamine, a vitamin B1 derivative, enhances chondroprotective effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in rabbit experimental osteoarthritis. *Inflamm Res.* 2005;54(6):249-55.
- Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN, Virmani R. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Current Opinion in Lipidology* 2004;15:575-82.
- Konstantinopoulos PA, Lehmann DF. The cardiovascular toxicity of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors: comparisons, contrasts and aspirin confounding. *J Clin Pharmacol* 2005;45:742-50.
- Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:144-53.
- Krenn V, Morawietz L, Haupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract.* 2002;198(5):317-25.
- Krum H, Aw TJ, Liew D, Haas S. Blood Pressure Effects of COX-2 Inhibitors. *Cardiovasc Pharmacol* 2006 May;47 Suppl 1:S43-8
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434-48.

- Kusunoki N, Yamazaki R, Kawai S. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblast by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis & rheumatism* 2002;46:3159-67.
- Kusunoki N, Ito T, Sakurai N, Suguro T, Handa H, Kawai S. A novel celecoxib derivative potently induces apoptosis of human synovial fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;31:796-803.
- Largo R, Alvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, Calvo E, Sánchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G. Glucosamine inhibits IL-1 β -induced NF κ B activation in human osteoarthritis chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:290-98.
- Larsson PT, Hallestam S, Rosfors S, Wallin NH. Circulating markers of inflammation are related to carotid artery atherosclerosis. *Int Angiol* 2001;24:43-51.
- Laehey KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*. *Cancer Research* 2002;62:625-31.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:497-504.
- Lu-Suguro JF, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Inhibitory action of glucosamine on platelet activation in guinea pigs. *Inflamm Res*. 2005;54:493-9.
- Ma L, Rudert WA, Harnaha J, Wright M, Machen J, Lakomy R, Qian S, Lu L, Robbins PD, Trucco M, Giannoukakis N. Immunosuppressive effects of glucosamine. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277:39343-349.
- Maillard M, Burnier M. Comparative cardiovascular safety of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2006;5:83-94.
- Mamdani M, Juurlink DN, Lee DS, Rochon PA, Kopp A, Naglie G, Austin PC, Laupacis A, Stukel TA. COX-2 inhibitors versus non-selective non-steroidal antiinflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study. *Lancet* 2004;363:1751-56.

- Manzi S, Wasko MC. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:321-5.
- Marshall S, Nadeaus O, Yamasaki K. Dynamics actions of glucose and glucosamine on hexosamine byosynthesis in isolated adypocytes. *The journal of Biological Chemistry* 2004;34:35313-19.
- Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, Tunon J, Egido J. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004;35:458-63.
- Matthias C, Schuster MT, Zieger S, Harreus U. COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib prevent oxidative DNA fragmentation. *Anticancer Res.* 2006;26(3A):2003-7
- Mendis E, Kim MM, Rajapakse N, Kim SK. Carboxy derivatized glucosamine is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-9 in HT1080 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(12):3105-10.
- Moore RA, Derry S, Matkinson GT, McQuay H. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systemic review and meta-analysis of information from company trial repots. *Arthritis Research* 2005;7:644-65.
- Morand EF, Leech M. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2005;10:12-22.
- Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nature Rewievs Drugs Discovery* 2006;5:399-411.
- Muckherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001;286:954-9.
- Mutru O, Laakso M, Isomaki H, Koota K. Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Cardiology* 1989;76:71-7.
- Nagata-Sakurai M, Inaba M, Goto H, Furumitsu Y, Inui H, Ishimura E, Shoji T, Nishizawa Y. Iflammation and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:3061-67.

- Nagatayamada S, Kurose H, Saito K., Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein Rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid fibroblasts. *Arthritis Research & therapy* 2005;7:476-84.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846-851.
- Neil KM, Orth MW, Coussens PM, Chan PS, Caron JP. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukin-1beta. *Am J Vet Res.* 2005;66:1861-9.
- Niederberger E, Manderscheid C, Grosch S, Schmidt H, Ehnert C, Geisslinger. Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:341-50.
- Noguchi M, Kimoto A, Kobayashi S, Yoshino T, Miyata K, Sasamata M. Effect of celecoxib on the pathophysiology of adjuvant arthritis rat. *Eur J Pharmacol* 2005;513:229-35.
- Nold M, Goede A, Eberhardt W, Pfeilschifter J, Muhl H. IL-18 initiates release of matrix metalloproteinase-9 from peripheral blood mononuclear cells without affecting tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1: suppression by TNF alpha blockage and modulation by IL-10. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003;367:68-75.
- Nomoto K, Oguchi S, Watanabe I, Kushiro T, Kanmatsuse K. Involvement of inflammation in acute coronary syndromes assessed by levels of high-sensitivity C-reactive protein, matrix metalloproteinase-9 and soluble vascular cell adhesion molecule-1. *J Cardiology* 2003;42:201-6.
- Oliver MF, Pyorala K, Shepherd J. Management of hyperlipidaemia. Why, when and how to treat. *Eur Heart J* 1997;18:371-5.
- Onodera M, Horiuchi Y, Nakahama K, Muneta T, Mano Y, Morita I. Induction of cyclooxygenase-1 in culures synovial cells isolated from rheumatoid arthritis patient. *Inflammation Re* 2004;53:217-22.
- Palacios I, López-Armada MJ, Hernández P, Sánchez-Pernaute O, Gutiérrez S, Miguélez R et al. Tenidap decreases IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 (MCP-1) mRNA expression in the synovial tissue of rabbits with antigen arthritis and in cultured synovial cells. *Clin Exp Immunol* 1998;111:588-96.
- Paramo JA, Rodriguez JA, Belouqui O, Orbe J. Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:303-11.

- Paramo JA, Belouqui O, Orbe J. COX-2: a new therapeutic target in atherosclerosis? *Med Clin (Barc)* 2006;126:782-6.
- Pasceri V, Yeh E. A tale of two diseases. Atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100: 2124-2126.
- Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, Maffei S, Pompela G, Auteri A, Puccetti L. Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med* 2006;6:38-44.
- Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CS, Lee CW, Lee CH. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1701-4.
- Pavlovic S, Du B, Sakamoto K, Khan KM, Natarajan C, Breyer RM, Dannenberg AJ, Falcone DJ. Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281:3321-8.
- Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Serum matrix metalloproteinase 3 in early rheumatoid arthritis is correlated with disease activity and radiological progression. *J Rheumatol* 2000;27:2761-8.
- Preston Mason R, Walter MF, McNulty HP, Lockwood SF, Byun J, Day CA, Jacob RF. Rofecoxib Increases Susceptibility of Human LDL and Membrane Lipids to Oxidative Damage: A Mechanism of Cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47 Suppl 1:S7-S14.
- Psaty B, Furberg CD. Cox-2 inhibitors- lessons in drug safety. *The New England Journal of Medicine*, 2005;medline..
- Rand ML, Warren JS, Mansour MK, Newman W, Ringler DJ. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol.* 1996 Mar;148(3):855-64
- Ransgasway S, Penn MS, Saidel GM, Chilsom GM. Exogenous oxidized low density lipoprotein injuries and alters the barrier junction of endothelium in rats in vivo. *Cir Res* 1997; 80:37-44.
- Rao M, Jaber BL, Balakrishnan VS. Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk: association or cause and effect? *Semin Dial* 2006;19:129-35.

- Ritchie ME. Nuclear factor- κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998;98:1707-13.
- Rizzo M, Berneis K, Corrado E, Novo S. The significance of low-density-lipoproteins size in vascular disease. *Int Angiol* 2006;25:4-9.
- Roh J-L, Sung M-W, Park S-W, Heo D-S, Lee DW, Kim KH. Celecoxib prevent tumor growth and distant metastasis in postoperative setting. *Cancer Research*, 2004;64:3230-35.
- Roman MJ, Devereux Rb, Schwartz JE, Lockshin MD, Paget SA, Davis A, Crow MK, Sammaritano L, Levine DM, Shankar BA, Moeller E, Salmon JE. Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases. *Hypertension* 2005;46:194-99.
- Roman MJ, Moeller E, Davis A, Paget SA, Crow MK, Lockshin MD, Sammaritano L, Devereux Rb, Schwartz JE, Levine DM, Salmon JE. Preclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2006;144:249-56.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993.362: 801-9.
- Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- Sambola A, Fuster V, Badimón JJ. Role of coronary risk factors in blood thrombogenicity and acute coronary syndromes. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:1001-9
- Sanchez-Pernaute O, López-Armada JM, Hernández P, Palacios I, Navarro F, Martínez J et al. Antifibroproliferative effect of tenidap in chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:2147-56.
- Sanghi S, MacLaughlin EJ, Jewell CW, Chaffer S, Naus PJ, Watson LE, Dostal DE. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a painful lesson. *Cardiovas Hematol Disord Drug Targets* 2006;6(2):85-100
- Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T et al. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 1992;89:97-108.
- Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003;108:2957-63.

- Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:1281-91.
- Shikhman AR, Amiel D, D'Lima D, Hwang S-B, Hu C, Xu A Hashimoto S, Kobayashi K, Saaho T, Lotz MK. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:89-94.
- Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res* 2004;64:5004-12.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 2000;284:1247-55.
- Simánek V, Kren V, Ulrichová J, Gallo J. The efficacy of glucosamine and chondritin sulfate in the treatment of osteoarthritis: are these saccharides drugs or nutraceuticals? *Biomed. Papers* 2005;149:51-56.
- Spektor G, Fuster V. Drug insight: ciclo-oxygenase 2 inhibitors and cardiovascular risk—where are we now? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2:290-300.
- Steffel J, Luscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC. Cyclooxygenase-2 Inhibition and Coagulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 1:S15-S20
- Steffens S, Mach F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz* 2004;29:741-48.
- Stevens RJ, Douglas KM, Saratzis AN, Kitas GD. Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med* 2005;6:1-24.
- Strand V. Expectations From Patients With Rheumatoid Arthritis Regarding COX-2s: Cutting to the Heart of the Matter. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47 Suppl 1:S55-9.
- Stumpf JL, Lin SW. Effect of glucosamine on glucose control. *Ann Pharmacother*. 2006;40(4):694-8.

- Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y, Öztaçan N, Süleyman B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol J Pharmacol* 2004;56:775-80.
- Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MJ, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Sutherland P, Vasan RS. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;109:2850-6. Epub 2004 Jun 1.
- Tanaka S, Tatsuguchi A, Futagami S, Gudis K, Wada K, Seo T, Miysui K, Yonozawa M, Nagata K, Fujimori S, Tsukui T, Kishida T, Sakamoto C. Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage cyclooxygenase 2 expression in colonic adenoma. *Gut* 2006;55:54-61.
- Tannock LR, Little PJ, Wight TN, Chait A. Arterial smooth muscle cell proteoglycans synthesized in the presence of glucosamine demonstrate reduced binding to LDL. *Journal of Lipid Research* 2003;43:149-57.
- Tsuji M, Hirakawa K, Kato A, Fujii K. The possible role of c-fos expression in rheumatoid cartilage destruction. *J Rheumatol* 2000;27:1606-21.
- Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2931-5.
- Uebelhart D, Thonar EJ, Zhang J, Williams JM. Protective effect of exogenous chondroitin 4,6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6 Suppl A:6-13.
- Uebelhart D, Thonar EJ, Delmas PD, Chantaine A, Vignon E. Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6 Suppl A:39-46.
- Uitterlinden EJ, Jarh H, Koevoet JLM, Jenniskens YM, Bierna-Zeinstra SMA, DeGroot J, Verhaar JAN, Weinans H, van Osch GJVM. Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritis cartilage explants. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006;15:250-57.
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Tigges AJ, Das PK. Fibrous and lipid-rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation: a concept. *Coron Artery Dis*. 1994 Jun;5(6):463-9
- Van Doornum S, McColl, Wicks IP. Accelerated Atherosclerosis. An Extraarticular Feature of Rheumatoid Arthritis? *Arthritis & Rheumatism* 2002; 4: 862-873.

- Volpi N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf) and its constituents in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:768-77.
- Volpi N. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for using the chondroitin sulfate for its treatment. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2004;4:119-27.
- Wang K, Tarakji K, Zhou Z, Zhang M, Forudi F, Zhou X, Koki AT, Smith ME, Keller BT, Lincoff AM, Penn MS. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decrease monocyte protein-1 expression and neointimal hyperplasia in the rabbit atherosclerotic balloon injury model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:61-67.
- Wata Y, kuruda T, Murasawa A, Tanabe N, Nakano N, Geijo F. Autoantibodies against oxidized low-density proteins (LDL) and carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:482-86.
- Walter MF, Jacob RF, Day CA, Dahlborg R, Weng Y, Mason RP. Sulfone COX-2 increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. *Atherosclerosis* 2004;177:235-43.
- Willcox BJ, Abbot RD, Yano K, Rodríguez BL, Willcox DC, Curb JD. C-reactive protein, cardiovascular disease and stroke: new roles for and old biomarker. *Exper Rev Neurother* 2004;4:507-18.
- Winyard PG, Tatzber F, Esterbauer H, Kus ML, Blake DR, Morris CJ. Presence of foam cells containing oxidized low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:677-80.
- Wolfe F, Mitchell DM, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:481-94.
- Wong E, Huang JQ, Tagari P, Riendeau D. Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001;157:393-402.
- Wong M, Toh L, Wilson A, Rowley K, Karchimkus C, Prior D, Ron CL, Dragicevic G, Harianto H, Wicks I, McColl G, Best J. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:81-89.
- Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127-37.

- Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB kinases: key regulators of NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29:72-79.
- Yeh ET. CRP as a mediator of disease .*Circulation* 2004;109:11-4.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):163-76
- Zhang G, Yu S, Gran B, Rostami A. Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response. *Journal of Immunology* 2005;175:7202-08.
- Zhang HS, Cao EH, Qin JF. Intracellular redox status modulates monocyte chemoattractant protein expression stimulated by homocysteine in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:258-65.